

NICHTHISTONPROTEINE VON DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Lokalisierung, Synthese und Phosphorylierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

ROSA MARIA WIDMER
aus Spreitenbach AG

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. R. W. Parish

Prof. Dr. H. R. Hohl

aku-Fotodruck Zürich

1980

NICHTHISTONPROTEINE VON DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM

Lokalisierung, Synthese und Phosphorylierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von

ROSA MARIA WIDMER

aus Spreitenbach AG

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. R. W. Parish

Prof. Dr. H. R. Hohl

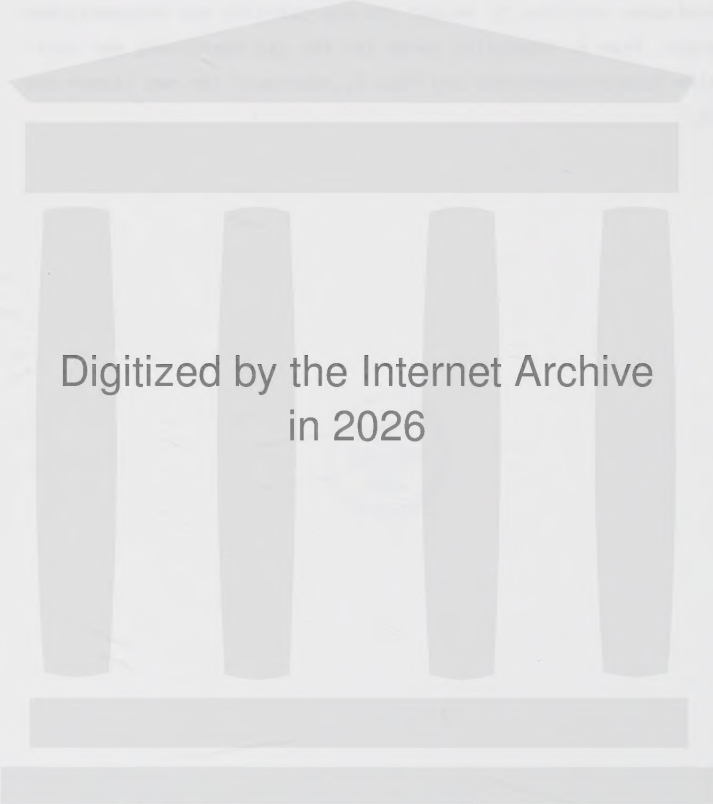
aku-Fotodruck Zürich

1980



Verdankungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. W. Parish für sein Interesse und seine verständnisvolle und fachkundige Leitung während der Dissertationszeit. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. H. R. Hohl zu Dank verpflichtet. Ich danke auch den Herren Dr. U. P. Roos und P. Gehrig für die Mithilfe bei elektro-nenmikroskopischen und Frau M. Weibel für die Mithilfe bei enzymatischen Untersuchungen. Frau S. Schmidlin danke ich für die Ausführung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese und Frau E. Aebersold für das Tippen des Manuskripts.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507205_0040

Abkürzungen

AS-CB	Amidoschwarz-Coomassie Blau
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Con A	Concanavalin A
Con A-Per	Concanavalin A-Peroxidase
Dd	Dictyostelium discoideum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Aethylendiamin-tetraessigsäure
MgAc	Magnesiumacetat
MP	Millipore
NH-Proteine	Nichthistonproteine
PEG	Polyäthylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	7
2. Material und Methoden	10
2.1. Organismus	10
2.2. Kern-Isolation	10
2.3. Fraktionierung der Kerne	12
2.3.1. Fraktionierung der Kernproteine auf Grund differentieller Löslichkeit	12
2.3.2. Isolation von Kernmembranen	13
2.3.3. Chromatin-Isolation	15
2.3.4. Isolation von Nukleolen	17
2.3.5. Isolation von Nukleosomen	17
2.4. DNA-Affinitäts-Säulen	18
2.4.1. Herstellen des Protein-Extraktes	18
2.4.2. DNA-Cellulose-Chromatographie	18
2.5. Markierung mit Isotopen	19
2.6. Methoden der Gelelektrophorese	20
2.6.1. Auftrennen von Proteinen in SDS-Poly- acrylamidgelen	20
2.6.2. Auftrennen von DNA-Fragmenten	21
2.6.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese von Nukleosomen	21
2.7. Methoden der Elektronen-Mikroskopie	22
2.8. Enzymatische Bestimmungen	23
2.9. Protein- und DNA-Bestimmungen	24
3. Resultate	25
3.1. Isolierung und Reinigung der Kerne	25
3.2. Charakterisierung der Kernproteine	28
3.2.1. Kernhomogenate	28
3.2.3. Darstellung der auf Grund differentieller Löslichkeit fraktionierten Kernproteine	30
3.3. Chromatin	30

3.3.1. Präparation von Chromatin	30
3.3.2. Proteinmuster	32
3.4. Nukleolen	32
3.4.1. Isolation von Nukleolen	32
3.4.2. Nukleolen-Proteine	34
3.4.3. DNA-Untereinheiten von Nukleolen	36
3.5. Nukleosomen-assoziierte Proteine	37
3.6. Kernmembranen	42
3.6.1. Isolation von Kernmembranen	42
3.6.2. Proteine der Kernmembran	44
3.6.3. Enzym-Aktivitäten von Kernmembranen	44
3.7. DNA-bindende Proteine	46
3.7.1. DNA-bindende Proteine des Cytoplasmas	46
3.7.2. DNA-bindende Proteine von Kernen	49
3.8. Synthese und Turnover von Kernproteinen während der Entwicklung	49
3.8.1. Stadienspezifische Proteinsynthese	49
3.8.2. Stadienspezifische Synthese von Glykoproteinen	54
3.8.3. Turnover von Kernproteinen	54
3.8.4. Synthese und Turnover von Kernproteinen während der Reaggregation von desaggregierten Zellen	55
3.9. Phosphorylierung von Kernproteinen	62
3.9.1. In vitro-Phosphorylierung der Kernproteine von stationären Ax-3-Zellen	62
3.9.2. In vitro-Phosphorylierung der Kernproteine von NC-4 im Verlaufe der Differenzierung	65
3.9.3. In vivo-Phosphorylierung der Kernproteine von NC-4 während der Differenzierung	68
3.9.4. In vitro-Phosphorylierung in Gegenwart von 0,15 M NaCl und Löslichkeit der Phosphoproteine in 0,15 M NaCl	70
4. Diskussion	73
4.1. Extraktion und Lokalisierung der NH-Proteine im Kern	73

4.2. Synthese und Phosphorylierung von NH-Proteinen während der Differenzierung	82
4.2.1. Synthese	82
4.2.2. Phosphorylierung	87
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	94
Anhang	"99"

1. Einleitung

Zelldifferenzierung ist nach heutiger Ansicht weitgehend das Resultat regulierter Genaktivität. Dabei wird allgemein angenommen, dass der Mechanismus der Genregulation auf Interaktionen von DNA mit regulatorischen Proteinen beruht.

Für Prokaryonten ist die spezifische Bindung zwischen DNA-Promotor-Sequenzen und regulatorischen Proteinen erwiesen (Operon-Modell). Für Eukaryonten dagegen ist die Situation noch umstritten.

Kandidaten für die Genregulation stellen die Nüchthiston (NH)-oder sauren Kernproteine dar, da sie zu einem gewissen Grade art- und gewebespezifisch sind (Review von Stein, 1976). Aenderungen in den NH-Proteinen können mit metabolischen Aktivitäten (Teng et al., 1971; Wang, 1971), dem Zellzyklus (Stein & Borun, 1972; Bhoree & Pederson, 1972), Hormonstimulation (O'Mally, 1972), Entwicklung (Vidali et al., 1973; Platz et al., 1975), Virus-Infektion und -Transformation (Lin et al., 1974; Krause et al., 1975) und mit der Reaktion auf verschiedene pharmakologische Agenzien (Ruddon & Rainey, 1970) in Zusammenhang gebracht werden.

Solche Aenderungen bedeuten jedoch keineswegs, dass NH-Proteine allgemein regulatorische Funktionen ausüben. Zu den NH-Proteinen zählen nämlich auch Proteine, die der Aufrechterhaltung der Kernstruktur dienen (Kernmembran, nukleäre Matrix oder Kernskelett), mit naszenter RNA assoziierte Proteine und Proteine mit enzymatischen Funktionen (z.B. Enzyme der Nukleinsäure-Synthese, -Modifikation und Degradation, Proteasen, Protein-Kinasen, -Methylasen, -Acetylasen, Phosphatasen).

Hinweise, dass NH-Proteine die Transkription beeinflussen können, stammen aus Versuchen mit ganz oder teilweise rekonstituiertem Chromatin (Wang, 1968; Paul et al., 1973; Stein et al., 1976). Diese Experimente werden jedoch angezweifelt, weil E. coli-RNA-

Polymerase angewendet wurde. Diese kopiert sowohl RNA wie DNA (Zasloff & Felsenfeld, 1977).

Silver & Elgin (1977) beweisen mit Antikörpern, dass spezifische NH-Proteine mit "Puffs" (aktive Loci) von *Drosophila*-Riesenchromosomen assoziiert sind. Zusätzlich zeigen Mayfield et al. (1978), dass diese Proteine durch DNase I-Behandlung freigesetzt werden. Es ist bekannt, dass aktive Gene durch dieses Enzym bevorzugt abgebaut werden (Weintraub & Groudine, 1976).

Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Dd) stellt ein einfaches und häufig gebrauchtes eukaryontisches System zur Untersuchung von Problemen der Entwicklung und Differenzierung dar (Loomis, 1975). Die morphologischen Veränderungen im Verlaufe des Lebenszyklus von Dd (s. Abb. 1.) sind von Änderungen in der Genaktivität begleitet (Firtel, 1972). Das Genom von Dd ist im Vergleich zu anderen Eukaryonten klein, nämlich nur elf mal komplexer als dasjenige von *E. coli* (Sussman & Rayner, 1971). Circa 20% der DNA von Dd befinden sich in den Mitochondrien und 25-30% der Kern-DNA liegen in reiterierten Sequenzen vor (Firtel & Bonner, 1972). Die übrige, sogenannte "single copy" DNA würde ausreichen, um 30'000-40'000 Gene zu kodieren. In neueren Studien, welche auf Hybridisierungsexperimenten mit zu polysomaler RNA komplementärer DNA (cDNA) beruhen, schätzen Firtel et al. (1978), dass für das Wachstum 3'600 und für die Entwicklung 400 Gene benötigt werden. Noch niedrigere Werte erhalten Alton & Lodish (1977), wenn sie die während Wachstum und Entwicklung synthetisierten Proteine untersuchen, nämlich 500 Gene für das Wachstum und 75-100 Gene für die Entwicklung. Schätzungen, welche auf genetischen Arbeiten beruhen, führen ebenfalls zu niederen Zahlen, nämlich 157 Gene für die Aggregation und 140 Gene für die weitere Entwicklung (Loomis et al., 1977).

Ueber die Kernproteine und insbesondere die NH-Proteine von Dd liegen erst wenige Arbeiten vor. Es ist bekannt, dass die DNA wie diejenige von höheren Eukaryonten mit Histonen assoziiert

(Coukell & Walker, 1973; Charlesworth & Parish, 1975 und 1977) und in Nukleosomen organisiert ist (Parish et al., 1977; Bakke et al., 1978). Firtel & Pederson (1975) zeigen das Vorhandensein von Ribonukleoprotein-Partikeln mit Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 15 kd bis 150 kd. Pederson (1977) beschreibt die Isolation von Chromatin mit einem komplexen Proteinmuster.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die NH-Proteine von Dd zu charakterisieren. Anfänglich wurden im Versuch, Proteinfraktionen entsprechend ihrer Assoziation mit DNA zu isolieren, verschiedene Extraktionsmethoden angewendet. Anschliessend wurden die Untereinheiten des Kernes wie Kernmembranen, Nukleolen, "Chromatin" und Nukleosomen isoliert und deren Proteine charakterisiert. Als letztes wurde die Synthese und Modifikation der NH-Proteine während der Entwicklung untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Organismus

Die Untersuchungen werden an zwei Stämmen des zellulären Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* durchgeführt, am axenisch wachsenden Stamm Ax-3 (erhalten von Loomis Jr.) und am haploiden Wildtyp-Stamm NC-4(H) (aus dem Labor von Raper).

Stamm Ax-3: Die Amöben werden in 500 ml HL-5 - Medium (Cocucci & Sussman, 1970) in 1,8 L Fernbach - Kulturflaschen gezogen. Die Kulturen werden bei 23°C auf einem Rotations- oder Reziproschüttler bei 55 Touren pro min gehalten. Für die Experimente werden Kulturen verwendet, die eine Dichte von ca. 5×10^7 Zellen/ml aufweisen.

Stamm NC-4(H) wird auf SM/2 - Agarplatten (Bonner, 1967) mit *Escherichia coli* als Futterquelle gezogen. Für die Experimente werden Flüssigkulturen verwendet (Sussman, 1961): 500 ml Medium in 1,8 L Fernbach - Kulturflaschen werden mit je einer Oese *E. coli* und NC-4 - Sporen beimpft und bei 23°C und 55 Touren pro min inkubiert. Nach 48 h ist das Futterbakterium aufgebraucht, und die Amöben befinden sich in der stationären Phase. Die Kultur erreicht eine Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml. Um die Differenzierung einzuleiten, werden die gewaschenen Amöben in PDF - Puffer (Newell & Sussman, 1969) suspendiert, auf MP - Filter ausgeplattet und bei 23°C inkubiert. Der Entwicklungszyklus ist in Abb. 1 dargestellt. Unter Laborbedingungen dauert die Differenzierung 24 h.

2.2. Kern-Isolation

Die Methode zur Isolation der Kerne beruht auf der von Charlesworth & Parish (1975 und 1977) beschriebenen Methode, ist aber leicht modifiziert: Ax-3 oder stationäre NC-4 - Zellen (1-5 x

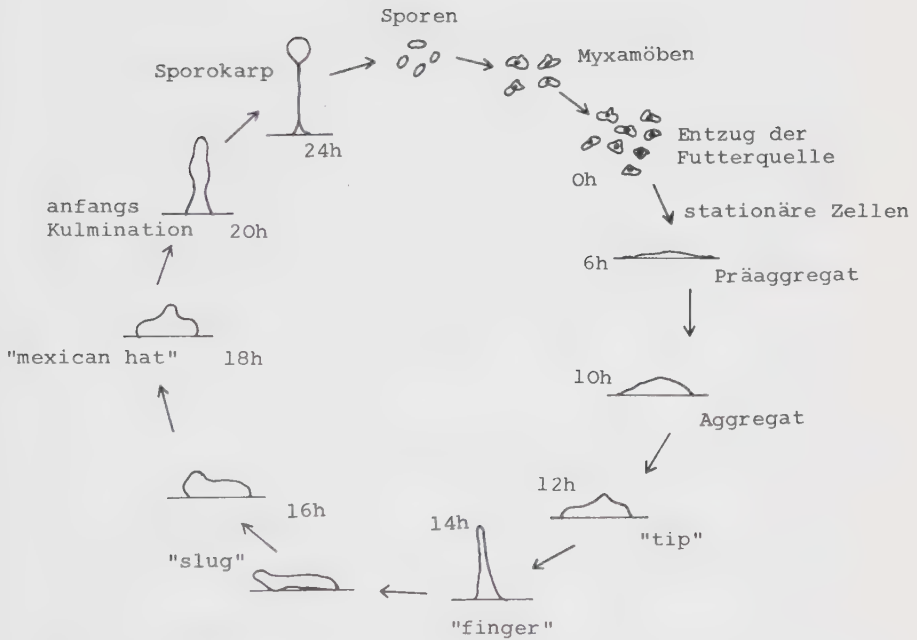


Abb. 1. Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*

10^8 Zellen/ml) werden nach dem Ernten und Waschen während 20 min bei 23°C in dest. H_2O gerührt, aggregierte NC-4 - Zellen in PDF, enthaltend 10 mM EDTA. Anschliessend werden die Zellen 2 min bei 700 g sedimentiert, in dest. H_2O resuspendiert (wiederum $1-5 \times 10^8$ Zellen/ml) und 2 Vol. kaltes SF - Medium (0,5 M Sorbitol - 2,5% (w/v) Ficoll - 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 - 2 mM MgCl_2 - 0,5 mM CaCl_2) zugegeben. Das Lysieren der Zellen erfolgt durch Zugabe von 10% Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 0,1%. Unter schwachem Rühren lysieren NC-4 - Zellen in 1-2 min, Ax-3 - Zellen in 10-20 min. Alle folgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt. Das Lysat wird 15 min bei 1'000 g zentrifugiert. Das Sediment wird in SF resuspendiert und durch 2,2 M Saccharose, enthaltend 2 mM MgCl_2 und 0,5 mM CaCl_2 , zentrifugiert (30 min bei 100'000 g, entspricht 27'000 rpm im Rotor SW 27 der Beckman Spinco L2 65B UZ). Dieses Sediment stellt eine reine Kernfraktion dar.

2.3. Fraktionierung der Kerne

2.3.1. Fraktionierung der Kernproteine auf Grund differentieller Löslichkeit

Reine Kerne werden nach folgendem Schema fraktioniert (modifizierte Methode nach Teng et al. (1971) und Le Stourgeon & Wray (1974)):

- Kerne 2 x in 50 Vol. 0,14 M NaCl suspendieren, während 10 min rühren und 5 min bei 3'000 g zentrifugieren; Ueberstände vereinigen und mit 3 Vol. Aceton bei -20°C ausfällen
- Kernsediment 2 x in 30 Vol. 0,25 N HCl suspendieren, während 10 min rühren und 5 min bei 3'000 g zentrifugieren; Ueberstände vereinigen, mit NaOH neutralisieren und mit 3 Vol. Aceton ausfällen
- Kernsediment 1 x in Chloroform - Methanol (1:1) - 0,2 N HCl suspendieren und 5 min bei 3'000 g zentrifugieren, Ueberstand verwerfen

- Kernsediment 1 x in Chloroform - Methanol (2:1) - 0,2 N HCl suspendieren und 5 min bei 3'000 g zentrifugieren, Ueberstand verwerfen
- Kernsediment 1 x in Aether suspendieren und 5 min bei 3'000 g zentrifugieren, Ueberstand verwerfen
- Kernsediment in TEM - Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,4 - 10 mM EDTA - 0,14 M 2-Mercaptoäthanol) suspendieren, mit 1 Vol. TEM - gesättigtem Phenol mischen, unter gelegentlichem Rühren 30 min stehen lassen, 10 min bei 12'000 g zentrifugieren und mit einer Spritze die Phenolphase sorgfältig entfernen. Phenol-extraktion wiederholen, Phenolphasen vereinigen und mit 3 Vol. Aceton bei -20°C ausfällen
- in Puffer und Interphase verbleibendes Material mit 3 Vol. Methanol versetzen und bei -20°C ausfallen lassen.

2.3.2. Isolation von Kernmembranen

2.3.2.1. Isolation von Kern-Membranen mittels Heparin und DNase I

Das hier beschriebene Vorgehen kombiniert die Methoden von Hil-debrand & Okinaka (1976), Bornens (1977) und Harris (1978). Die gereinigten Kerne werden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 10 mM Na_2HPO_4 suspendiert. Anhand des Diagramms nach Layne (1957) wird die DNA - Konzentration bestimmt und die Suspension so verdünnt, dass die DNA - Konzentration ca. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beträgt. Unter leichtem Bewegen des Gefäßes werden pro ml Suspension 1 μl Heparin - Lösung (Stammlösung 100 mg/ml) zugegeben. Innerhalb weniger Sekunden wird die Suspension viskös. Diese wird 20 min bei 23°C mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I (2465 U/mg, RNase-frei, Worthington) inkubiert. Anschliessend wird die Suspension wieder in Eis gestellt, mit 1/3 Vol. 1 M Saccharose versetzt, auf Stufengradienten (2,2 M / 2,0 M / 1,8 M / 1,5 M Saccharose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgeladen und 90 min bei 100'000 g zentrifugiert. Dabei reichern sich die Kernmembranen zwischen 1,5 M und 1,8 M Saccharose an. Diese Banden werden gesammelt, mit 1 Vol. 10 mM Tris verdünnt

und die Kernmembranen 30 min bei 100'000 g sedimentiert.

2.3.2.2. Andere Methoden, die zur Isolierung von Kernmembranen erprobt wurden

Isolation von Kernmembranen mittels Heparin nach Bornens (1977): Die Kerne werden in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 10 mM Na_2HPO_4 bei einer Endkonzentration von 200 μg DNA /ml suspendiert. Diese Suspension wird mit 1,5-facher Menge Heparin (w/w bezogen auf die DNA - Konzentration) versetzt, kurz gemischt und mit Puffer 5 x verdünnt. Die Kernmembranen werden 40 min bei 45'000 g sedimentiert.

Isolation von Kernmembranen mittels NaHCO_3 und DNase I nach Harris (1978): Gereinigte Kerne werden 2 x in 1 mM NaHCO_3 , pH 7,2 gewaschen, in 1 mM NaHCO_3 10 min bei 22°C mit DNase I (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und wieder 2 x mit 1 mM NaHCO_3 gewaschen. Die teilweise gereinigten Kernmembranen werden auf Stufengradienten (2,0 / 1,8 / 1,5 / 0,25 M Saccharose in 10 mM Tris) geladen und 60 min bei 100'000 g zentrifugiert. Intakte Kernmembranen sollten sich zwischen 1,5 und 1,8 M Saccharose anreichern.

Isolation von Kernmembranen mittels hoher Salzkonzentration nach Franke (1974) und Philipp et al. (1976): Gereinigte Kerne werden in 0,1 mM Tris- HCl, pH 7,5 gründlich suspendiert und entweder so lange in verdünntem Puffer gelassen, bis sie deutlich anschwellen und ev. zu zerreißen beginnen oder mit mehreren kurzen Stößen ultraschallt. Die Suspensionen werden dann mit 3 Vol. 2,0 M KCl - 0,25 M Saccharose - 5 mM Tris-HCl, pH 7,2 gemischt und während 1-2 h bei 4°C gerührt. Die Membranen werden 90 min bei 100'000 g sedimentiert, nochmals mit hoher Salzkonzentration behandelt und zentrifugiert. Das Sediment wird in 5 mM Tris resuspendiert und auf 66% (w/v) Saccharose aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 90 min bei 75'000 g sollten sich die Kernmembranen in der Interphase befinden.

Isolation von Kernmembranen mittels DNase I und hoher Salzkonzentration nach Jackson (1976): Gereinigte Kerne werden in 0,1 mM $MgCl_2$ gründlich suspendiert, mit 4 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 versetzt, nach Zugabe von 10 $\mu g/ml$ DNase I homogenisiert und 15 min bei 22°C inkubiert. Die Verdauung wird durch Zugabe von $\frac{1}{2}$ Vol. eiskaltem 0,1 mM $MgCl_2$ - 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gestoppt und die Suspension 20 min bei 27'000 g zentrifugiert. Das gelatinöse Sediment wird in 2,0 M NaCl aufgenommen, homogenisiert, zentrifugiert und in 10 mM Tris - 0,1 mM $MgCl_2$ gewaschen.

Isolation einer nukleären Proteinmatrix nach Herlan & Wunderlich (1976): Gereinigte Kerne werden in 2 mM $MgCl_2$ - 3 mM $CaCl_2$ - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 gewaschen und im gleichen Puffer, enthaltend 50 mM NaCl, mit je 100 $\mu g/ml$ DNase I und RNase bei 22°C inkubiert. Nach 1 h werden 9 Vol. 2,2 M NaCl in obigem Puffer zugegeben. Nach 10 min wird die Suspension 25 min bei 3'000 g zentrifugiert und das Sediment nochmals 30 min mit je 100 $\mu g/ml$ DNase I und RNase inkubiert. Die Verdauung wird durch Zentrifugieren und nochmaliges Waschen gestoppt.

2.3.3. Chromatin-Isolation

2.3.3.1. Chromatin-Isolation durch Lyse der Kerne in dest. Wasser

Die hier beschriebene Methode wurde von Fuhrer-Krüsi nach persönlichen Mitteilungen von Dierks-Ventling erarbeitet: Gereinigte Kerne werden in 10 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 0.15 M NaCl suspendiert und 3 min bei 3'000 g sedimentiert. Anschliessend werden die Kerne in 10 Vol. dest. H_2O aufgenommen, die Suspension mehrmals durch eine Pasteur-Pipette getrieben und 5 min bei 3'000 g zentrifugiert. Das Suspendieren in Wasser wird wiederholt, bis der Ueberstand klar bleibt und das "Sediment" völlig gelatinös erscheint. In diesem Zustand wird auch eine stärkere Zentrifugation nötig, 10 min bei 10'000 g.

Bei NC-4 drängt sich ein zusätzlicher Reinigungsschritt auf: Das Chromatin wird nochmals in dest. H_2O suspendiert, auf 30% (w/v) Saccharose geschichtet und 15 min bei 1'800 g zentrifugiert. Dabei reichert sich das Chromatin über der Saccharose an, und die im Verlauf der Kern- und Chromatinisolation angereicherten E. coli und Sporenhüllen finden sich im Sediment.

2.3.3.2. Andere Methoden, die zur Chromatin-Isolation erprobt wurden

Lysieren der Kerne durch Homogenisieren in dreifach dest. H_2O nach Stein et al. (1975): Die gereinigten Kerne werden mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 - 0,15 M NaCl extrahiert, dann in dreifach dest. H_2O suspendiert und von Hand in einem Glasgefäß nach Potter-Elvehjem homogenisiert, bis die Kerne lysieren. Anschließend wird die Suspension 20 min in Eis gestellt, um das Chromatin anschwellen zu lassen. Nach dem Abzentrifugieren (15 min bei 12'000 g) wird das Chromatin in Wasser resuspendiert, nochmals homogenisiert und abzentrifugiert.

Lysieren der Kerne mit Ultraschall nach Pederson (1977): Gereinigte Kerne werden in 10 mM KCl - 10 mM MgAc - 12% (w/v) Saccharose - 30 mM Hepes, pH 7,9 suspendiert und 10 sec mit 40 W ultrabeschallt. Die aufgebrochenen Kerne werden auf 30% (w/v) Saccharose geladen und 20 min bei 3'000 g zentrifugiert. Dabei reichern sich die Nukleolen im Sediment an, während Chromatin und Ribonucleoprotein-Partikeln in der Interphase bleiben. Diese wird auf Stufengradienten (60% / 45% (w/v) Saccharose) gebracht und 7,5 h bei 90'000 g zentrifugiert. Dabei sammelt sich das Chromatin im Sediment, und die Ribonucleoprotein-Partikeln reichern sich zwischen 45% und 60% Saccharose an.

2.3.4. Isolation von Nukleolen

Als Ausgangsmaterial dienen ungereinigte Kerne, wie sie bei der Kernisolation nach dem Lysieren der Zellen in 1 Vol. H_2O - 2 Vol. SF - 0,1% Triton X-100 vorliegen. Dieses Lysat wird 50 sec bei max. Geschwindigkeit in einem Sorvall Omnimixer 17220 homogenisiert, sofort mit 1 Vol. 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 4 mM $CaCl_2$ verdünnt und 15 min bei 15'000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Nukleolen werden in 10 mM Tris - 2 mM $CaCl_2$ gründlich resuspendiert und 30 min bei 100'000 g durch Saccharose-Stufengradienten (1,5 M / 2,2 M) zentrifugiert. Das Sediment stellt die gereinigte Nukleolen - Fraktion dar.

2.3.5. Isolation von Nukleosomen (Parish et al., 1977)

Gereinigte Kerne werden in 1 ml 20 mM Tris- HCl, pH 7,8 mit 150 Einheiten Micrococcus-Nuklease (Worthington) während 5-10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 0,2 ml 0,2 M EDTA gestoppt. Nach Zugabe von 0,2 ml 10% Sarkosyl wird 2 x mit Phenol extrahiert und die DNA mit 2 Vol. Aethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Das Sediment wird in 70% Aethanol - 30% Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,8 - 1 mM EDTA) gewaschen und in 100 µl Puffer, enthaltend 1 µg/ml RNase, gelöst.

Zur Isolation von Nukleosomen aus Nukleolen werden weniger Enzym-Einheiten und/oder kürzere Verdauungszeiten angewendet. Anstelle der Sarkosyl-Behandlung werden die gestoppten Proben mit SDS bis zur Endkonzentration von 0,4% versetzt und 3 h bei 37°C mit 100 µg/ml Proteinase K inkubiert.

Die weitere Behandlung (Phenol-Extraktion, DNA-Fällung) erfolgt wie oben beschrieben.

Zur Isolation von nukleosomalen Proteinen werden die Kerne nach der Inkubation mit Micrococcus-Nuklease und der Zugabe von EDTA

über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 - 0,1 mM EDTA - 0,1 mM PMSF dialysiert. Nach der Zentrifugation von 10 min bei 3'000 g wird dem Ueberstand $MgCl_2$ bis zu einer Endkonzentration von 3 mM zugegeben. Die Proben werden 2 h bei -15°C gehalten und anschliessend die nukleosomalen Proteine 10 min bei 10'000 g sedimentiert.

2.4. DNA-Affinitäts-Säulen

2.4.1. Herstellen des Protein-Extraktes

Das Verfahren beruht im wesentlichen auf der von Magun (1976) beschriebenen Methode. Alle Schritte erfolgen bei 4°C. Die gewaschenen Zellen werden in 1,5 Vol. Puffer A (0,05 M NaCl - 10 mM Tris-HCl, pH 8,1 - 0,1% Brij 58 - 1 mM PMSF - 1 mM EDTA - 10 mM Mercaptoäthanol - 10% Glycerin) ultrabeschallt, bis praktisch alle Zellen lysiert sind. Nach der Zentrifugation von 15 min bei 20'000 g wird das Sediment nochmals in Puffer A aufgenommen, ultrabeschallt und zentrifugiert. Die Ueberstände werden vereinigt und 1 h bei 100'000 g zentrifugiert. Dieser Ueberstand wird durch Zugabe von kristallinem NaCl auf eine Endkonzentration von 1,7 M NaCl gebracht, mit $\frac{1}{2}$ Vol. 30% PEG 6000 - 1,7 M NaCl in Puffer A versetzt und 30 min gerührt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren bei 7'500 g während 20 min entfernt und der Ueberstand während 48 h gegen 4 x 20 Vol. Puffer A dialysiert. Die dialysierte Protein-Lösung wird 15 min bei 21'000 g zentrifugiert und der Ueberstand, im folgenden Cytosol genannt, auf Säulen geladen.

2.4.2. DNA-Cellulose-Chromatographie

Die Chromatographie erfolgt an nativer sowie an denaturierter Cellulose-gebundener Kalbsthymus-DNA. Je 4 ml in Puffer A gequollene DNA-Cellulose (P.L. Biochemicals) werden in Säulen

von 0,9 cm x 14 cm gepackt und mit Puffer A äquilibriert. Mit einer Durchflussrate von 14 ml/h werden 40 - 50 ml Cytosol erst durch die Säule mit nativer, anschliessend durch die Säule mit denaturierter DNA gepumpt. Nach dem Spülen mit Puffer A werden die DNA-bindenden Proteine mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0,10 / 0,15 / 0,25 / 0,6 / 2,0 M) eluiert. Die gesammelten Fraktionen werden mit 3 Vol. Aceton ausgefällt und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

2.5. Markierung mit Isotopen

Protein-Markierung mit ^{14}C -Acetat und Gykoprotein-Markierung mit ^{14}C -Glucosamin: NC-4 - Amöben werden in Flüssigkulturen angezogen und auf MP-Filter ausgeplattet. Zu verschiedenen Zeiten während der Differenzierung werden pro Ansatz 50 μCi $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetic acid, sodium salt (40 - 60 mCi/mmol, Amersham), bzw. 25 μCi D- $[1-^{14}\text{C}]$ -Glucosamine hydrochloride (5-10 mCi/mmol, NEN) in möglichst kleinen Tropfen auf 5 MP-Filter verteilt und die Zellen nach ein bis mehreren Stunden Inkubation geerntet.

Für die Markierung mit anorganischem Phosphat werden NC-4 - Amöben mit PDF-Lösung, die anstelle des Phosphats 5 mM Morphoäthanol-sulfonsäure enthält (Firtel et al., 1972) ausgeplattet. Pro Ansatz werden 60 - 100 μCi $^{32}\text{P}_i$ (1 mCi/ml, Amersham) auf 5 MP-Filter verteilt und die Zellen nach zwei bis mehreren Stunden geerntet.

Die in vitro - Phosphorylierung von Kernproteinen wird mit Adenosin 5'- $[\gamma -^{32}\text{P}]$ -Triphosphat in einem modifizierten Protein-Kinase-Ansatz nach Sampson (1977) untersucht: Für die Szintillations-Zählungen werden je 200 μl Kern (ca. 5×10^8 Kerne/ml)- bzw. Nukleolen-Suspension sedimentiert, in 20 μl Protein-Kinase-Puffer (20 mM K-Phosphat, pH 7,2 - 10 mM MgSO_4 - 10 mM DTT - 5 μM ^{32}P -ATP) suspendiert und 0 - 120 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Um den Einfluss von Polyaminen, Natriumbisulfit, cAMP und cGMP auf die Protein-Phosphorylierung zu untersuchen, werden den Kinase-Ansätzen je 0,5 mM Spermin und Spermidin (Atmar et al., 1978) bzw. 50 mM Natriumbisulfit (Gurley et al., 1978) bzw. 10^{-6} M cAMP oder cGMP zugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,5 ml eiskalter 10% TCA - 5 mM ATP (nicht markiert) gestoppt. Die ausgefällten Proben werden auf 3MM - Whatman-Filter ($\varnothing = 2,3$ cm) gebracht und mit je 5 ml kalter 10% TCA gewaschen. Anschliessend werden die Filter in Aethanol - Diäthyläther (1:1) und absolutem Aether gespült, getrocknet und in 10 ml Szintillationslösung (4 g Omnifluor / 1 L Toluol) in einem Isocap/300 - Szintillationszähler ausgezählt. Für die Gelelektrophorese mit anschliessender Autoradiographie werden Sedimente von 20 - 30 ul isolierten Kernen bzw. Nukleolen in 100 ul Protein-Kinase-Puffer suspendiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,2 ml SDS-Sample-Puffer und sofortiges Erhitzen auf 100°C gestoppt.

2.6. Methoden der Gelelektrophorese

2.6.1. Auftrennen von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Proben werden in SDS-Proben-Puffer (3% SDS - 10% Glycerin - 5% Mercaptoäthanol - 0,001% Bromphenolblau - 0,76% Trizma-HCl (Sigma), pH 6,8) gelöst und die Proteine mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in 0,75 mm dicken 10%, 12% oder 15% SDS-Acrylamid-Slabgelen mit einer konstanten Spannung von 200 V aufgetrennt.

Das Anfärben der Proteine erfolgt in zwei Schritten: Die Gele werden ca. 20 min in 0,25% Amidoschwarz 10B (Merck) in 7% Essigsäure gefärbt, in 7% Essigsäure entfärbt und anschliessend in 0,025% Coomassie brilliant blue G 250 in 25% Isopropanol - 10% Essigsäure nachgefärbt und in 7% Essigsäure entfärbt. Die Glykoproteine werden mit der Con A - Peroxidase - Färbung nach

Wood & Saranina (1975) dargestellt: Die Gele werden während 3 h in 10% Essigsäure - 25% Isopropanol fixiert, über Nacht in dest. H₂O gewaschen, 2 h in Con A (0,5 mg/ml) inkubiert, über Nacht in 15 mM Phosphat-Puffer, pH 6,8 gewaschen, 2 h in Peroxidase (0,1 mg/ml Phosphat-Puffer) inkubiert, über Nacht wieder in Phosphat-Puffer gewaschen, während ca. 30 min in 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (50 mg/100 ml Phosphat-Puffer) - 0,015% Perhydrol gefärbt und in 7% Essigsäure fixiert.

Fluorographie- oder Szintillations-Autoradiographie nach Bonner & Laskey (1974): Die Gele werden 2 x während 30 min in DMSO eingelegt, während 3 h mit 22% PPO in DMSO (w/v) imprägniert und anschliessend 1 h in dest. H₂O eingelegt. Die getrockneten Gele werden auf Fuji X-Ray Filme aufgelegt und während einigen Tagen bis mehreren Wochen bei -70°C exponiert. Nach Laskey & Miles (1975) wird die Empfindlichkeit der Filme durch kurzes Vorbelichten erhöht.

2.6.2. Auftrennen von DNA-Fragmenten

Die DNA-Proben (s.2.3.5.) werden mit ca. 1/5 Vol. 80% Glycerin - 4% SDS - 0,1% Bromphenolblau gemischt und auf 2% Acrylamid - 0,5% Agarose - Gelen nach Compton et al. (1976) aufgetrennt. Die Gele werden mit Ethidiumbromid (0,1 mg pro 100 ml Elektrophorese-Puffer) gefärbt und in ultraviolettem Licht (254 nm) photographiert.

2.6.3. Zweidimensionale Gelelektrophorese von Nukleosomen (modifizierte Methode nach Todd & Garrard, 1977)

Kerne bzw. Nukleolen werden wie unter 2.3.5. beschrieben mit micrococcaler Nuklease verdaut, mit EDTA versetzt, über Nacht dialysiert und zentrifugiert. Der Ueberstand wird mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. 10% verdichtet. In der ersten

Dimension werden die DNA-Protein-Partikeln in 2,5% Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylen bisacrylamid = 20 : 1) - 0,5% Agarose Slabgelen (15 x 10 x 0,3 cm) mit 40 mM Tris - 3,2 mM Natriumacetat - 3,2 mM EDTA, pH 8,0, aufgetrennt. Der Elektrophoresepuffer wird nach dem Vorlauf (mind. 1 h bei 100 V) gewechselt. Die Elektrophorese wird bei 14°C mit einer Spannung von 100 V durchgeführt und dauert ca. 3 h. Als Marker dient Bromphenolblau. Nach dem Lauf werden die Gele 5 min in 36 mM Tris - 30 mM Na₂HPO₄ - 10 mM EDTA - 1% SDS, pH 7,8, inkubiert, in Bahnen geschnitten und satt auf die Slabgele für die zweite Dimension (15 x 10 x 0,3 cm) gelegt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt in 36 mM Tris - 30 mM Na₂HPO₄ - 10 mM EDTA - 0,1% SDS, pH 7,8, während ca. 14 h mit einer Spannung von 30 V. Für das Auftrennen der Proteine werden 8% Acrylamid (Acrylamid : Methylenbisacrylamid = 30 : 1) - 0,5% Agarose-Gele verwendet, für das Auftrennen der DNA-Fragmente 4% Acrylamid (Acrylamid : Methylenbisacrylamid = 20 : 1) - 0,5% Agarose Gele. Die Protein-gele werden mit AS-CB bzw. Con A - Peroxidase (Glykoproteine) gefärbt (s. 2.6.1.). Die DNA-Gele werden nach dem Lauf während 4 h in 50% Methanol (einmal wechseln) gewaschen, mit Ethidiumbromid gefärbt und in UV photographiert (s. 2.6.2.).

2.7. Methoden der Elektronen-Mikroskopie

Negativ-Kontrastierung: Suspensierte Kernmembranen werden auf kohlebedampfte und mit Formvar-Folie bespannte 400 mesh Netzchen gebracht und mit 2% wässrigem Uranylacetat kontrastiert.

Ultradünnschnitte: Die zu untersuchenden Kernfragmente werden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 suspendiert, mit 1,5% Glutaraldehyd vorfixiert, mit 1/15 M Phosphat-Puffer, pH 6,8 gewaschen und in 2% OsO₄ nachfixiert. Nach Einschluss in 2%-igen Agar werden die Präparate in 2% wässrigem Uranylacetat vorkontrastiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 - 100%) entwässert, nach Spurr (1969) eingebettet und auf einem Reichert OmU3-Ultramikrotom ge-

schnitten. Die Dünnschnitte werden in 1% Uranylacetat und in einer Bleicitratlösung nach Reynolds (1963) kontrastiert.

Die Untersuchung der negativ kontrastierten Präparate und der Ultradünnschnitte erfolgt in einem Hitachi-Elektronen-Mikroskop, Typ HU-11E, bei 75 kV.

2.8. Enzymatische Bestimmungen

Die im folgenden beschriebenen Ansätze werden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von isolierten Kernen bzw. Kernmembranen verwendet. Die Enzymsätze enthalten Kerne bzw. Kernmembranen in einer Konzentration, die 50 - 100 µg Protein pro ml entspricht.

ATPase: Kerne bzw. Kernmembranen werden in 0,02 M Tris-Maleat, pH 7,0 - 5 mM MgCl_2 mit 2×10^{-8} M $[\text{Adenine-U-}^{14}\text{C}]$ Adenosine 5'-triphosphate (Amersham, 275 mCi/mmol) bei 20°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten werden Aliquote entnommen und in einer Beckman Mikrofuge zentrifugiert. Die Ueberstände werden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Radioaktivität mit einem Berthold-Scanner gemessen.

cAMP-Phosphodiesterase: Kerne bzw. Kernmembranen werden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 - 50 mM NaCl - 50 mM KCl - 0,5 mM CaCl_2 - 5 mM MgCl_2 mit 3×10^{-7} M $[\text{8-}^3\text{H}]$ Adenosine 3', 5'-cyclic phosphate inkubiert (Amersham, 20-30 Ci/mmol). Zu verschiedenen Zeiten werden Aliquote entnommen, zentrifugiert, die Ueberstände dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und die Radioaktivität in einem Berthold-Scanner gemessen.

Die Bestimmung der sauren und alkalischen Phosphatase erfolgt mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat (Parish, 1972).

Die NADH-Cytochrom c - Reduktase wird spektrophotometrisch nach der Methode von Ray (1977) bestimmt.

2.9. Protein- und DNA-Bestimmungen

Protein-Bestimmungen werden nach der Methode von Lowry et al. (1951) ausgeführt.

DNA-Konzentrationen werden nach der Diphenylamin-Methode von Giles & Myers (1965) bestimmt. Zur schnellen Bestimmung, z.B. bei der Isolation von Kernmembranen mittels Heparin, wird die DNA-Konzentration nach Layne (1957) aus dem Verhältnis von OD_{280} zu OD_{260} errechnet.

3. Resultate

3.1. Isolierung und Reinigung der Kerne

Die Methode der Isolierung von Kernen in SF-Medium (enthaltend 0,5 mM CaCl_2 - 2 mM MgCl_2) und 0,1% Triton X-100 (Charlesworth & Parish, 1977) führt regelmässig zu vollständiger Lyse der Zellen. Hingegen erweist sich die Reinigung der Kerne durch Sorbitol-Gradienten als ungenügend. Die Kernfraktion ist häufig mit Plasmamembranen kontaminiert. Die Reinigung durch Stufengradienten von 80% / 65% (w/v) Saccharose (Charlesworth & Parish, 1975) ergibt wohl eine bessere Trennung, erlaubt aber nur eine geringe Ausbeute.

Eine reine Kernfraktion, verbunden mit einer rel. guten Ausbeute, ergibt die Zentrifugation durch 2,2 M Saccharose, enthaltend 0,5 mM CaCl_2 und 2 mM MgCl_2 . Beim Aufladen der Kernsuspension ist unbedingt darauf zu achten, dass die Grenzschicht zur 2,2 M Saccharose gut durchmischt wird. Ansonsten verkleben die Kerne und Membranfragmente miteinander, so dass die Kerne nur zu einem kleinen Prozentsatz sedimentieren. Abb. 2 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten einer Kernfraktion, isoliert aus stationären Ax-3-Zellen. Die Aufnahmen zeigen, dass die beschriebene Isolationsmethode eine reine Kernfraktion ergibt und die Kerne dabei gut erhalten bleiben. Auch die Doppelmembran der Kernhülle lässt sich erkennen. Solchermassen gereinigte Kerne weisen ein Protein:DNA-Verhältnis von ca. 5:1 für NC-4-Kerne und ca. 10:1 für Ax-3-Kerne auf.

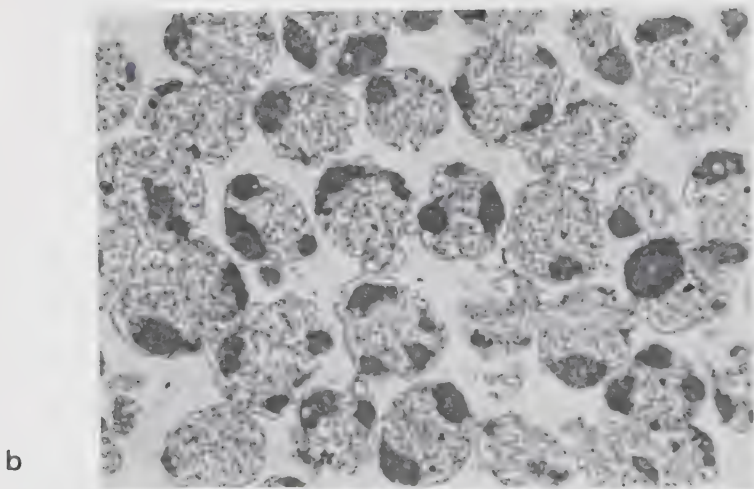
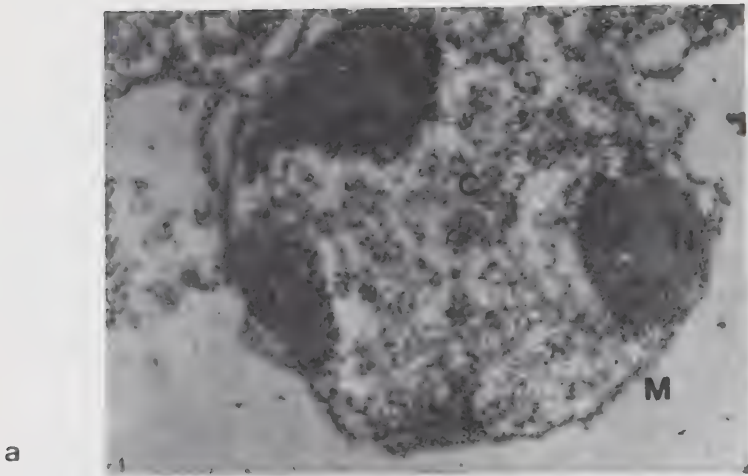


Abb. 2. Isolierte Kerne von *Dictyostelium discoideum*, Stamm Ax-3. Dünnschnitte, Uranylacetat-gefärbt. N= Nukleolus, C= "Chromatin", M= Doppelmembran.

a) 36'000 x b) 9'400 x

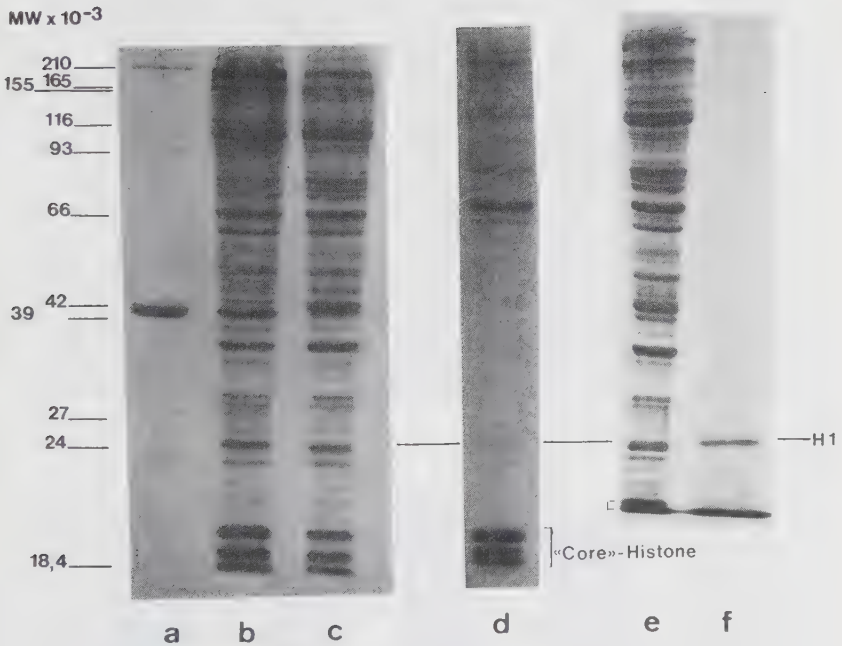


Abb. 3. Kernproteine von *Dictyostelium discoideum*, 10% SDS-Polyacrylamidgele, AS-CB-Färbung. a) Actin und Myosin aus Plasmamembran von NC-4, b) Kernhomogenat von NC-4, c) Kernhomogenat von Ax-3, d) "crude"-Nukleosomen von NC-4, e) Kernhomogenat von Ax-3, f) Histon "H1" von Ax-3. Als Marker für die Bestimmung der Molekulargewichte dienen Myosin h.c. (=schwere Myosinketten), 210 kd; Untereinheiten der RNA-Polymerase, 165 kd (β), 155 kd (β), 39 kd (α); Galaktosidase, 116 kd; Phosphorylase B, 93 kd; Albumin Bovine Plasma, 66 kd; Con A, 27 kd; Trypsinogen, 24 kd; β -Lactoglobulin, 18,4 kd.

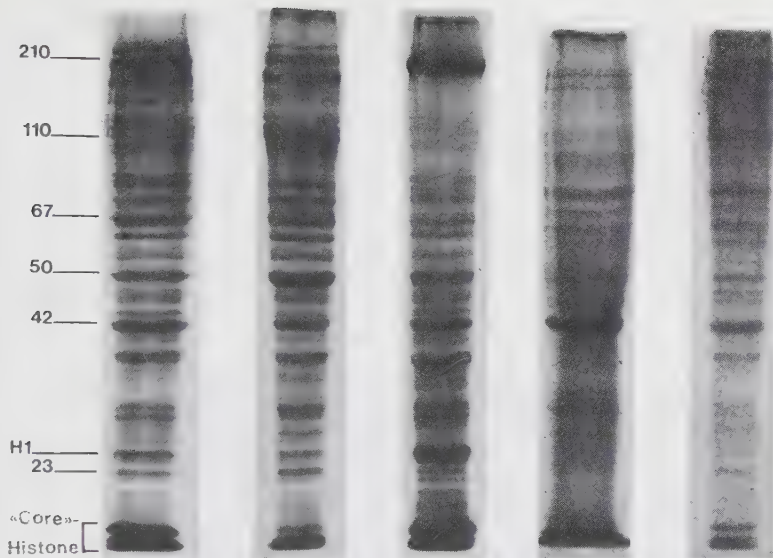
3.2. Charakterisierung der Kernproteine

3.2.1. Kernhomogenate

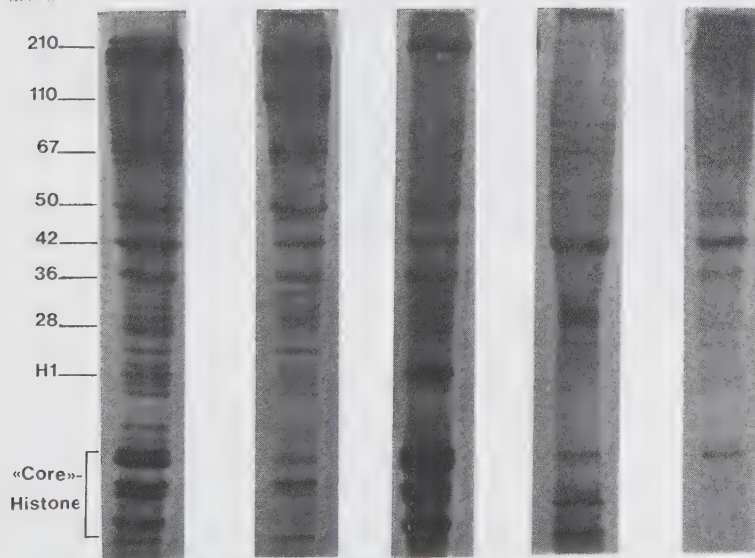
Beim Auftrennen von Kernhomogenaten in SDS-Polyacrylamidgelen lassen sich mit der AS-CB-Färbung ca. 70 Banden unterscheiden (Abb. 3b,c,e). Ihre Molekulargewichte werden anhand der in der Legende aufgeführten Marker-Proteine bestimmt. Aus dem Vergleich mit "crude" Nukleosomen (s. Material und Methoden; Abb. 3d) wird ersichtlich, dass die Histone, ausgenommen H1, als markante Banden an der Front in Erscheinung treten. Allerdings trennen sie sich in den 10%-Gelen nicht immer in einzelne Banden auf (Abb. 3e). H1 (die Probe wurde freundlicherweise von Fuhrer-Krüsi zur Verfügung gestellt) migriert mit der Bande von 24,5 kd (Abb. 3e,f). Vergleiche mit den Proteinen von Plasmamembranen von Dd zeigen, dass in den Kernhomogenaten ein Protein von 42 kd (Actin) und eines von 210 kd (schwere Myosinketten = Myosin h.c.) vorkommen. Die Bande von 42 kd ist in Kernhomogenaten von NC-4 immer deutlich erkennbar, in Kernhomogenaten von Ax-3 dagegen tritt eine Bande von 43-44 kd stärker auf. Die übrigen dominanten Proteine (170 kd, 110-125 kd, 76-87 kd, 67 kd, 61 kd, 49-50 kd, 36 kd, 29 kd, 24,5 kd und 23 kd) treten in beiden Stämmen in ungefähr gleicher Konzentration auf. Mit der Con A -Peroxidase-Färbung lassen sich nach dem Auftrennen von Kernhomogenaten ca. 40 Glykoproteine nachweisen (s. Kapitel 3.5.2. Kernmembranen, Abb. 18c). Ihre Molekulargewichte liegen zwischen 32 kd und 210 kd.

Abb. 4. Differentielle Löslichkeit der Kernproteine von Stamm NC-4, AS-CB-Färbung, a) 10% SDS-Polyacrylamidgele, b) 12% SDS-Polyacrylamidgele, 1) Kernhomogenat, 2) in 0,15 M NaCl lösliche Proteine, 3) in 0,25 N HCl lösliche Proteine, 4) Phenol-lösliche Proteine, 5) restliche Proteine.

MW x 10⁻³



MW x 10⁻³



3.2.2. Darstellung der auf Grund differentieller Löslichkeit fraktionierten Kernproteine

Abb. 4 zeigt die Fraktionierung der Kernproteine von NC-4 - Amöben auf Grund ihrer Löslichkeit in 0,15 M NaCl, in 0,25 N HCl und in Phenol. In der NaCl-Fraktion (Bahn 2) lassen sich praktisch alle Proteine, die in Kernhomogenaten vorkommen, nachweisen. Einige Proteine sind in dieser Fraktion angereichert, z.B. 110 kd, 76 kd, 67 kd, 49-50 kd. Die Histone werden kaum extrahiert. Von den verbleibenden Proteinen werden mit 0,25 N HCl (Bahn 3) v.a. die Histone extrahiert. Angereichert werden in dieser Fraktion auch die Banden von 27-29 kd, 36 kd und 210 kd (Myosin h.c.). Von den Proteinen, die nach der Salz- und der Säure-Extraktion zurückbleiben, lassen sich mit Phenol (Bahn 4) nebst drei Proteinen, die im Bereich der Histone migrieren, hauptsächlich Proteine mit Molekulargewichten von 26-80 kd extrahieren. Angereichert wird das Protein von 42 kd (Actin). Unter den nach der Phenolextraktion verbleibenden sogenannten restlichen Proteinen (Bahn 5) befinden sich v.a. solche mit höherem Molekulargewicht. Auch in dieser Fraktion sind die meisten der im Kernhomogenat vorhandenen Proteine erkennbar. Doch ist zu beachten, dass nur wenig niedermolekulare Proteine erhalten bleiben.

3.3. Chromatin

3.3.1. Präparation von Chromatin

Als Kriterium für die Gewinnung von Chromatin wird nach Bonner et al. (1968) das "Gelatinös-Werden" der Fraktion betrachtet. Ein gelatinöses und klares Sediment lässt sich aus Dd-Kernen mit der unter 2.3.3.1. beschriebenen Methode erreichen. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass die Lyse der Kerne möglichst schonend erreicht wird. Anstelle des mechanischen Aufbrechens der Kerne in einem Teflon-Hand-Homogenisator (Stein et al.

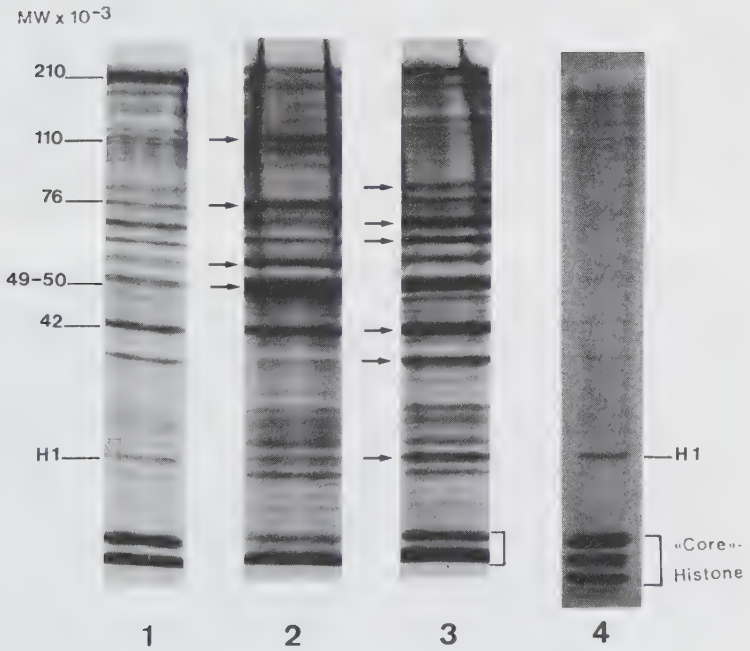


Abb. 5. Fraktionierung der Kernproteine von Stamm NC-4 im Verlauf der Chromatin-Präparation. 10% SDS-Polyacrylamidgele. AS-CB-Färbung. 1) Kernhomogenat, 2) NaCl-lösliche Proteine, 3) H₂O-lösliche Proteine, 4) "chromosomale" Proteine

1975) oder durch Ultraschallung (Firtel & Pederson, 1975; Pederson, 1977) werden die Kerne mehrmals sorgfältig durch eine Pasteur-Pipette getrieben. Die lichtmikroskopische Kontrolle zeigt, dass bei der NaCl-Extraktion die Kerne anschwellen, aber noch nicht aufbrechen. Der grösste Teil der Kerne lysiert beim ersten Suspendieren in dest. H_2O . Nach dem zweiten Suspendieren in Wasser lassen sich keine ganzen Kerne mehr erkennen. In den Ueberständen der 3. und v.a. der 4. H_2O -Behandlung sind auch kaum mehr Proteine enthalten. Das zum Schluss als gelatinöses Sediment vorliegende Chromatin erscheint im Lichtmikroskop als amorphes Material.

3.3.2. Proteinmuster

Abb. 5 zeigt die Proteinmuster der Fraktionen, die im Verlauf der Chromatin-Isolation erhalten werden. Sowohl in der 0,15 M NaCl-Fraktion (Bahn 2) wie in der ersten H_2O -Fraktion (Bahn 3) lassen sich alle der im Kernhomogenat vorkommenden Proteine nachweisen. In der NaCl-Fraktion sind einzelne Proteine angereichert, z.B. 49-50 kd, 76 kd, 110 kd. Wenn man berücksichtigt, dass in der Bahn 3 mehr Proteine aufgetragen wurden, lassen sich zwischen Kernhomogenat und H_2O -Fraktion kaum Unterschiede feststellen. In der Chromatin-Fraktion (Bahn 4) bilden die Histone den quantitativen Hauptanteil. Doch sind praktisch alle der im Kernhomogenat vorhandenen Proteine auch in der Chromatin-Fraktion enthalten. Mit der Con A -Peroxidase-Färbung lassen sich in der Chromatin-Fraktion nur zwei Glykoproteine von 210 kd und 44 kd nachweisen (nicht gezeigt).

3.4. Nukleolen

3.4.1. Isolation von Nukleolen

Die Isolation von Nukleolen nach der unter 2.3.4. beschriebenen Methode eignet sich v.a. für Ax-3-Zellen. Die Kerne dieses

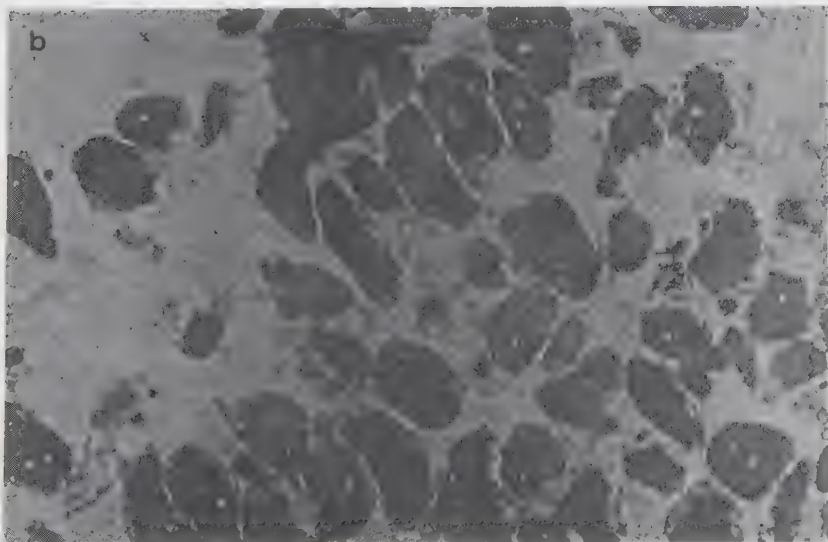
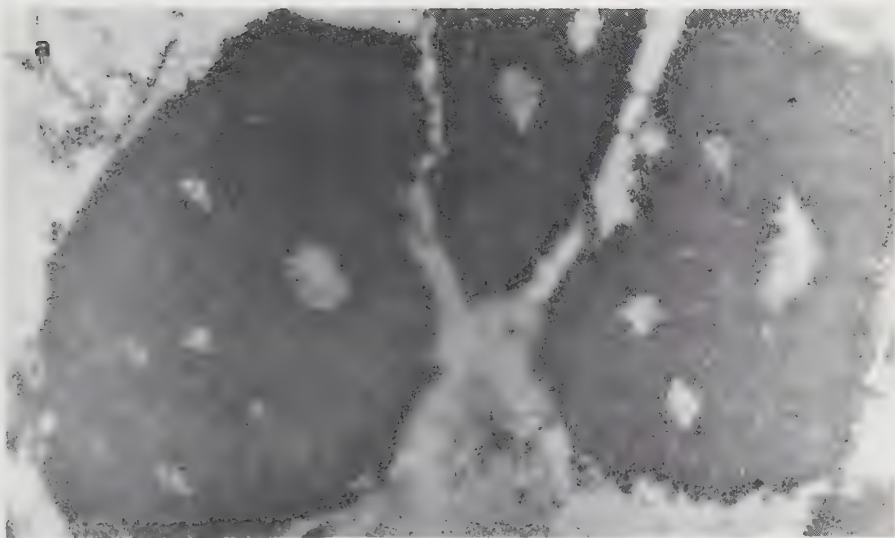


Abb. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten einer Nukleolen-Fraktion von *Dictyostelium discoideum*, Stamm Ax-3. a) 44'000 x, b) 14'000 x

Stammes sind beim Lysieren in verdünntem SF-Medium rel. gross und enthalten deutlich voneinander abgegrenzte Nukleolen. In diesem Zustand lassen sich die Kerne mit dem Omnimixer so aufbrechen, dass die Nukleolen als einzelne kompakte Partikeln erhalten bleiben. Abb. 6 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten eines Nukleolensedimentes. Elektronenleere Strukturen, gut erkennbar in Abb. 6a, beschreiben u.a. auch Rubin et al. (1976) für Nukleolen von *Acanthamoeba*. Diese Strukturen lassen sich auch in Nukleolen von ganzen Kernen erkennen (Abb. 2b).

3.4.2. Nukleolen-Proteine

Wie Abb. 7a zeigt, ergeben Homogenate von Nukleolen in 10% SDS-Polyacrylamidgelen das gleiche Proteinmuster wie Kernhomogenate. Abb. 7b zeigt die Proteine, die sich von den Nukleolen lösen, wenn diese vorerst in 0,15 M NaCl und anschliessend mehrmals in dest. Wasser suspendiert werden. Diese Behandlung entspricht der Präparation von Chromatin aus Kernen. Bei Nukleolen führt dieses Vorgehen nie zu einem gelatinösen, d.h. chromatinähnlichen Sediment. Mit der NaCl- und den beiden ersten Wasserbehandlungen werden sehr viele Proteine befreit. Spezifisch angereichert sind im NaCl-Extrakt (Bahn 2) ein Protein von 110 kd, im ersten Wasser-Extrakt (Bahn 3) ein Protein von 44 kd und im zweiten Wasser-Extrakt (Bahn 4) die Proteine von 210 kd (Myosin h.c.) und 42 kd (Actin). Mit weiteren Wasser-Extraktionen lassen sich nur noch wenige Proteine befreien (Bahnen 5, 6). Das verbleibende Sediment (Bahn 7) ergibt ein von unbehandelten Nukleolen recht verschiedenes Proteinmuster.

Im Lichtmikroskop lässt sich verfolgen, wie die Struktur der Nukleolen im Verlauf der beschriebenen Behandlung vorerst ge-lockert wird und die Nukleolen schliesslich auseinanderfallen.

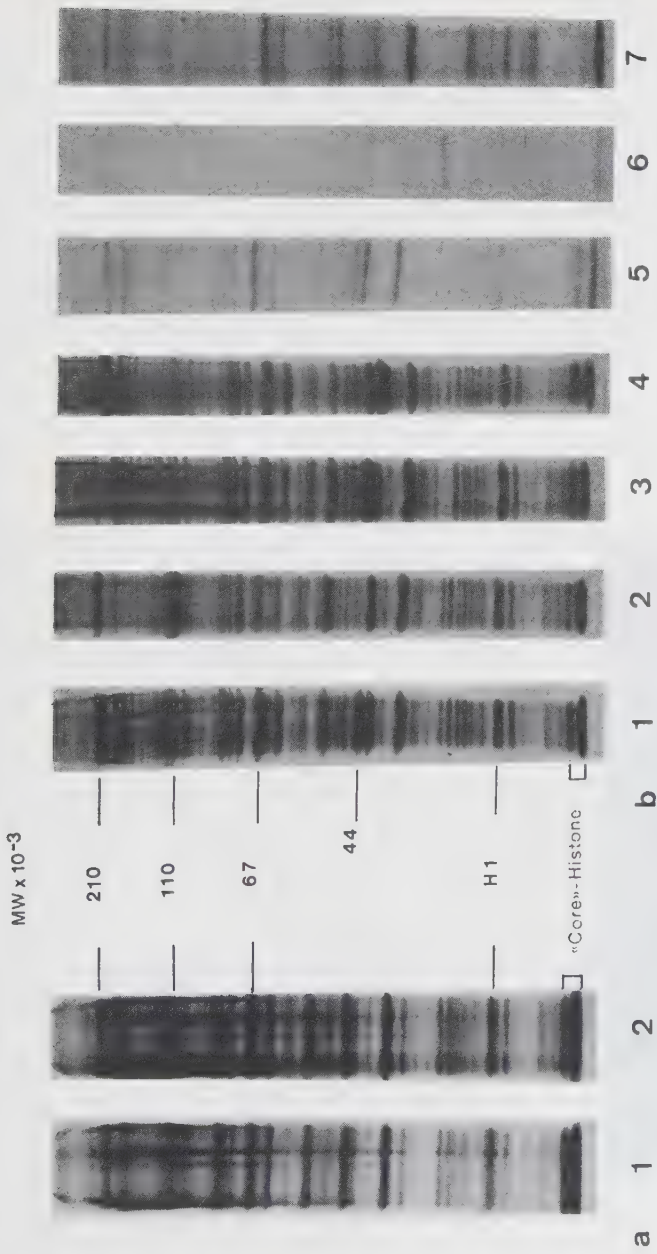


Abb. 7. Nukleolen-Proteine von Stamm Ax-3. 10% SDS-Polyacrylamidgele, AS-CB-Färbung, a) Vergleich Kernhomogenat-Nukleolenhomogenat, 1) Kernhomogenat, 2) Nukleolenhomogenat; b) Löslichkeit der Nukleolen-Proteine, 1) Nukleolen-Homogenat, 2) NaCl-Extrakt, 3) 1. H_2O -Extrakt, 4) 2. H_2O -Extrakt, 5) 3. H_2O -Extrakt, 6) 4. H_2O -Extrakt, 7) in H_2O unlösliches Restsediment.

3.4.3. DNA-Untereinheiten von Nukleolen

Die Darstellung von Nukleosomen aus Nukleolen gelingt nur, wenn die Proben nach der Inkubation mit micrococcaler Nuklease mit Proteinase K behandelt werden (s. Material und Methoden). Wenn direkt phenolisiert wird, reichert sich sehr viel Material an der Interphase an, und aus der wässrigen Phase können kaum mehr Nukleosomen isoliert werden. Die Verdauung von Nukleolen mit micrococcaler Nuklease ergibt eine regelmässige Nukleosomen-Struktur. Diese weist charakteristische Unterschiede zu derjenigen von Kernen auf (Abb. 8).



Abb. 8. DNA-Gel (Polyacrylamid-Agarose: 2%-0,5%) von mit micrococcaler Nuklease verdauten Nukleolen (a) und Kernen (b)

MN = Mono-Nukleosome oder Monomere,
DN = Dinukleosomen, TN = Trinukleosomen, etc.

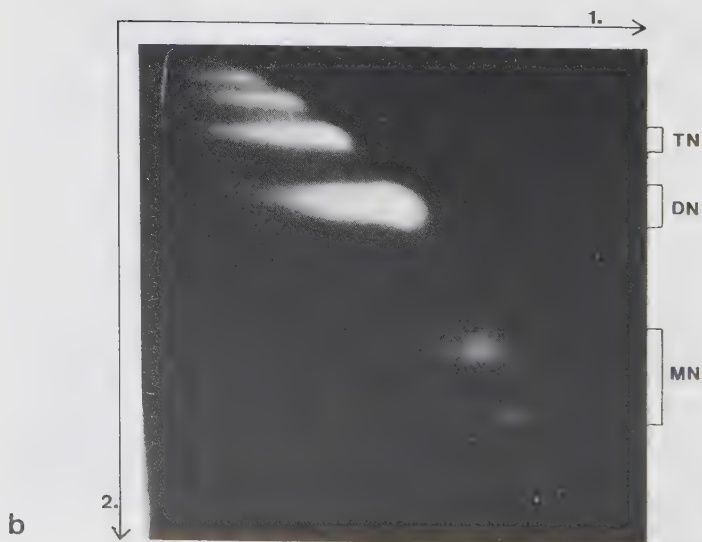
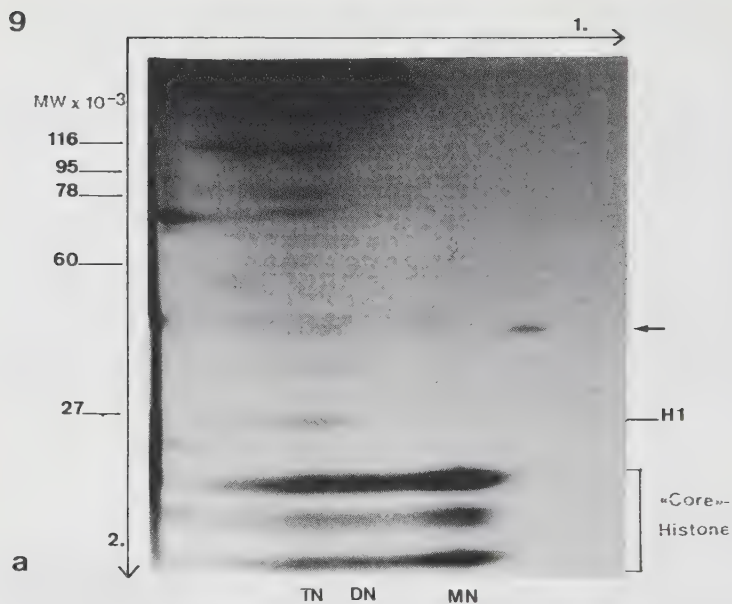
In der Region der Dimeren und Trimeren lassen sich je zwei scharfe Banden unterscheiden. Deren Grössen stimmen mit der oberen bzw. unteren Grenze der entsprechenden Multimerbanden von Kernen überein. Zwischen den Doppelbanden der Dimeren und Trimeren befinden sich zwei ebenso deutliche Zwischenbanden. Diese lassen sich unter optimalen Bedingungen auch in Nukleosomenfraktionen von Kernen erkennen, treten dann aber nie so deutlich auf. Doppelbanden, wie sie zwischen den Dimeren und Trimeren vorkommen, finden sich - allerdings weniger deutlich erkennbar - auch zwischen den Tri-, Tetra- und Pentameren. Die Grössen der DNA-Fragmente können aus der im Anhang beigefügten Publikation gesehen werden.

3.5. Nukleosomen-assoziierte Proteine

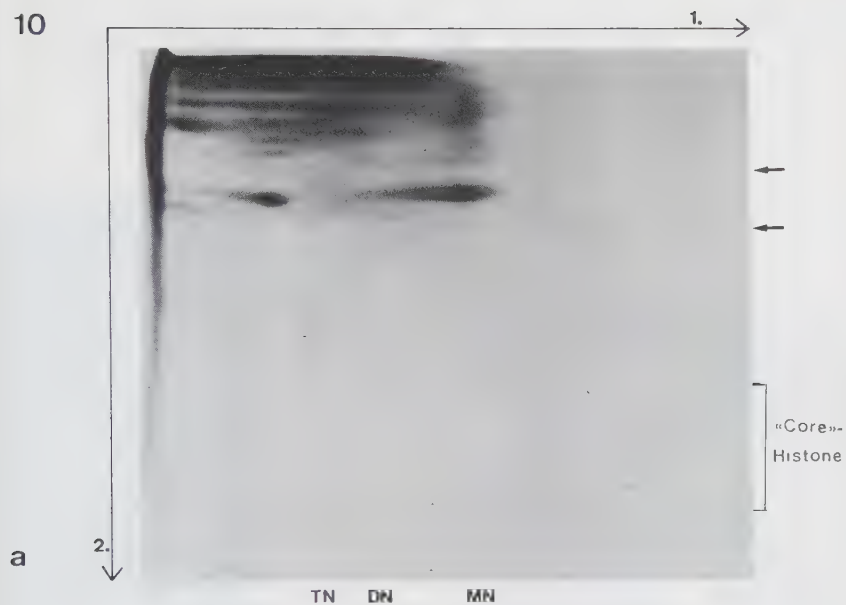
Zur Untersuchung der mit Nukleosomen assoziierten Proteine wird der Ueberstand von mit micrococcaler Nuklease verdauten und über Nacht dialysierten Kernen bzw. Nukleolen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Abb. 9a zeigt das Proteinmuster von aus Kernen isolierten Nukleosomen. Die schnell migrierenden "Core"-Histonproteine bilden die Hauptkomponenten. H1 dagegen liegt in relativ geringer Konzentration vor. Dies deutet darauf hin, dass ein beträchtlicher Teil während der Nukleosomen-Präparation und der Elektrophorese verloren geht.

Abb. 9. Zweidimensionale Gele von mit micrococcaler Nuklease verdauten Kernen. a) Proteine, b) DNA. Als Marker für die Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen dienen: β -Galaktosidase, 116 kd; Phosphorylase b, 95 kd; Transferrin, 78 kd; Katalase, 60 kd; Con A, 27 kd.

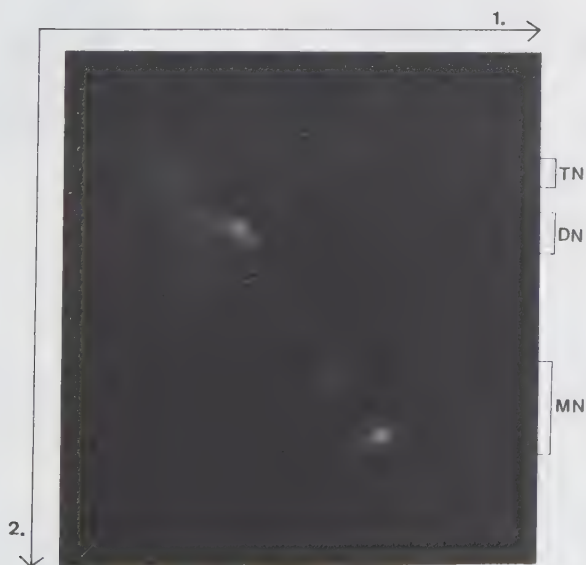
Abb. 10. Zweidimensionale Gele von mit micrococcaler Nuklease verdauten Nukleolen. a) Proteine, b) DNA



10



b



Neben den Histonen lassen sich mehrere "Spots" von NH-Proteinen erkennen. Einige NH-Proteine mit Molekulargewichten von ca. 28-45 kd treten auch im Bereich der Mono-Nukleosomen (MN) auf. Ein NH-Protein von 40 kd (Pfeil) migriert in der ersten Dimension weiter als die Mono-Nukleosomen.

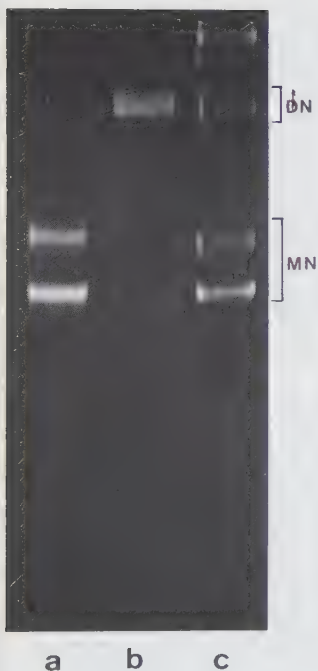
Einige Proteine mit Molekulargewichten über 100 kd sind auch in Präparationen vorhanden, die so weit verdaut werden, dass in den DNA-Gelen nur noch Mono-Nukleosomen erkennbar sind (Gele nicht gezeigt). In diesem Bereich lassen sich mit der Con A-Per-Färbung auch mehrere Glykoproteine nachweisen (Resultate nicht gezeigt). Wir vermuten, dass diese Proteine bzw. Glykoproteine in der ersten Dimension als nicht an DNA gebundene Aggregate migrieren.

Obwohl sich die Muster der DNA-Untereinheiten von Nukleosomen aus Kernen (Abb. 9b) und Nukleolen (Abb. 10b) nur geringfügig unterscheiden, migrieren die Proteine doch sehr verschieden. In zweidimensionalen Gelen von Nukleosomen aus Nukleolen lassen sich nur Spuren der "Core"-Histonproteine erkennen (Abb. 10a). Diese gehen vermutlich während der ersten Nukleosomen-Präparation und/oder während der ersten Dimension der Elektrophorese verloren. Ebenso sind kaum NH-Proteine von 28-45 kd vorhanden. Relativ viele Banden treten dagegen im Bereich der höher-molekularen Proteine auf. Zu beachten sind auch zwei NH-Proteine (ca. 40 kd und 90 kd, Pfeile), die in der ersten Dimension weiter als die Mono-Nukleosomen migrieren.

Da die Auftrennung der Proteine in zweidimensionalen Gelen begrenzt ist und sich nur relativ kleine Mengen aufladen lassen, werden Mono- und Dinukleosomen aus den Gelen der ersten Dimension extrahiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente zeigt die Reinheit solcher Deoxynukleoprotein-Partikeln (Abb. 11).

Abb. 12a zeigt die Proteine der Mono- und Dinukleosomen aus Kernen. Den Hauptanteil bilden die basischen Nukleoproteine. Die Konzentration von H1 ist in den Monomeren geringer als in den

11



12

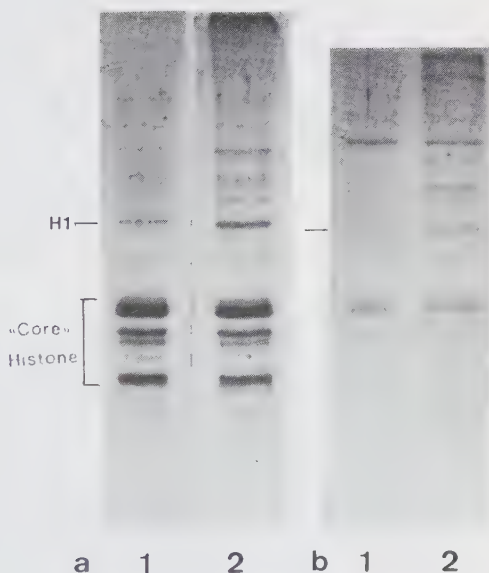


Abb. 11. DNA-Gel (Polyacrylamid-Agarose: 5,5%-0,5%) von aus der ersten Dimension extrahierten DNP-Banden. a) Mononukleosomen, b) Dinukleosomen, c) gesamte DNP-Fraktion

Abb. 12. Proteingele (15% Polyacrylamid-0,1% SDS) von aus der ersten Dimension extrahierten DNP-Partikeln. a) Kerne, b) Nukleolen; 1) Mononukleosomen, 2) Dinukleosomen.

Dimeren. Die Dinukleosomen enthalten auch mehr NH-Proteine.

Die Mono- und Dinukleosomen aus Nukleolen (Abb. 12b) zeigen wiederum den sehr geringen Gehalt an Histonproteinen.

In den NH-Proteinen der Nukleosomen aus Kernen und aus Nukleolen lassen sich ebenfalls Unterschiede feststellen.

3.6. Kernmembranen

3.6.1. Isolation

Die Isolation von Kernmembranen von Dd gelingt mit der unter 2.3.2.1. beschriebenen Methode. Dabei wird der Inhalt der Kerne durch Zugabe von Heparin (Bornens, 1977) solubilisiert. Das Auflösen des Kerninhalts und v.a. der Nukleolen kann im Lichtmikroskop verfolgt werden, und nach 1-2 min ist deutlich die lichtmikroskopisch leere Kernhülle erkennbar. Um gute Kernmembranen zu erhalten, ist es unbedingt nötig, mit stark verdünnter Kernsuspension zu arbeiten und eine Heparin-Konzentration anzuwenden, die ein DNA:Heparin-Verhältnis von 1:1 ergibt. Bei erhöhter Heparin-Konzentration fallen die Kernhüllen auseinander, bei zu geringer Konzentration löst sich der Kerninhalt nur ungenügend auf. Abb. 11a zeigt eine Kernhülle, wie sie direkt nach der Heparin-Behandlung vorliegt. An solchen Kernhüllen hängt häufig fibrilläres Material. Dieses verschwindet mit der Behandlung von DNase I. Die Notwendigkeit einer DNase-Behandlung lässt sich auch aus dem Verhalten im Saccharose-Gradienten ableiten. Kernmembranen, welche nach dem Solubilisieren des Kerninhaltes zusätzlich mit DNase I (mindestens 3 µg/ml und 20 min bei RT) behandelt werden, sammeln sich zwischen 1,5 M und 1,8 M Saccharose an, während ungenügend oder nicht mit DNase behandelte Kernhüllen sich an tieferen Stufen anreichern bzw. im Sediment vorliegen. Die Proteinmuster solcher Sedimente (nicht gezeigt) weisen im Vergleich zu Kernhomogenaten nur sehr geringe Unterschiede auf.

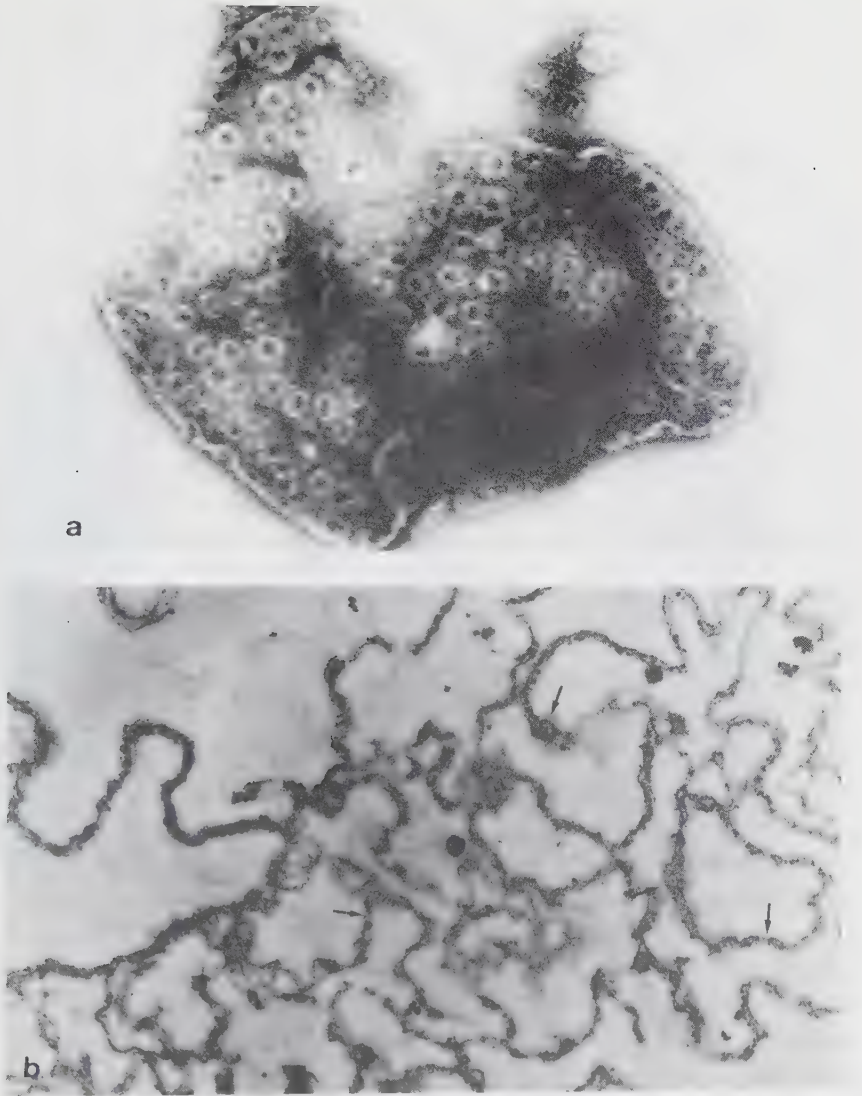


Abb. 13. Kernmembran von *Dictyostelium discoideum*, Stamm Ax-3.
a) Kernhülle nach der Solubilisierung des Kerninhalts mit Heparin. Negativ-Kontrastierung, 44'000 x. b) Dünnschnitt durch gereinigte Kernmembranfraktion. Die Pfeile markieren parallel bzw. quer zur Oberfläche geschnittene Kernporen, 35'000 x.

Abb. 13b zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultra-Dünnschnittes, durch eine gereinigte Kernmembranfraktion.

3.6.2. Proteine der Kernmembran

Abb. 12 zeigt das Proteinmuster von gereinigten Kernmembranen. Die AS-CB-Färbung (Abb. 12a,b) ergibt für Kernmembranen ein im Vergleich zu Kernhomogenaten sehr reduziertes Proteinmuster. Die wichtigsten Proteine der Kernmembran (AS-CB) weisen Molekulargewichte von ca. 26 kD, 27 kD, 42 kD (Actin), 54 kD, 68 kD, 95-120 kD, 180 kD und 210 kD (Myosin, h.c.) auf. Die Histone fehlen vollständig. Die Con A-Per-Färbung zeigt deutlich, dass die Kernmembranen v.a. Glykoproteine enthalten (Abb. 12c). In den Kernhomogenaten lassen sich 35-40 meist schwache Glykoprotein-Banden erkennen. Grössere Konzentrationen weisen die Glykoproteine mit folgenden Molekulargewichten auf: 31 kD, 49 kD, 110 kD, 116 kD, 200 kD. Diese und die meisten der in den Kernhomogenaten nur schwach angefärbten Glykoproteine treten in Kernmembranen in bedeutend höherer Konzentration auf.

3.6.3. Enzym-Aktivitäten von Kernmembranen

Mit Heparin und DNase I isolierte Kernmembranen werden auf folgende Enzym-Aktivitäten getestet: ATPase, cAMP-Phosphodiesterase, alkalische und saure Phosphatase, NADH-Cytochrom c-Reduktase. Als Vergleich dient eine Kernsuspension von entsprechender Proteinkonzentration. In Kernmembranen ist keines der getesteten Enzyme nachweisbar. Hingegen zeigen isolierte Kerne einen ATP-Abbau von ca. 4×10^{-6} M pro min und mg Protein. Die cAMP-Phosphodiesterase und die NADH-Cytochrom c-Reduktase zeigen in Kernen kaum messbare Aktivitäten, die alkalische und die saure Phosphatase lassen sich nicht nachweisen.

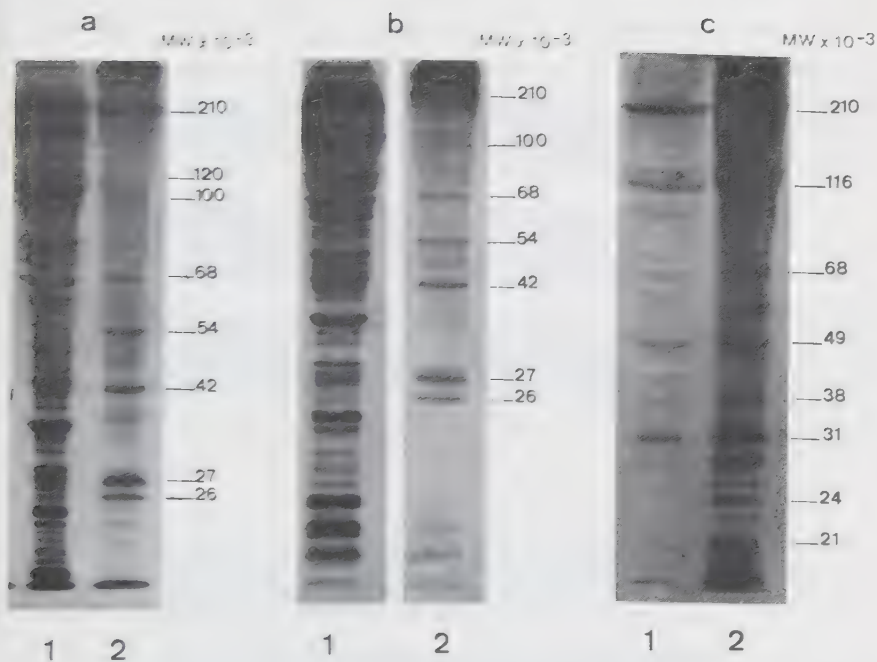


Abb. 14. Proteine der Kernmembran von *Dictyostelium discoideum*, Stamm Ax-3. a) und b) AG-GE-Färbung, 10% bzw. 12% SDS-Polyacrylamidgels; c) Coom. A-Far-Färbung, 10% SDS-Polyacrylamidgel. 1) Kernhomogenat, 2) Kernmembran

3.7. DNA-bindende Proteine

3.7.1. DNA-bindende Proteine des Cytoplasmas

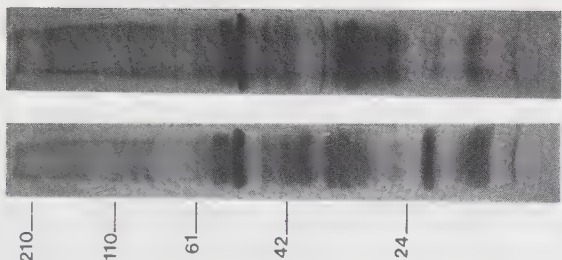
Das sogenannte Cytosol von stationären NC-4-Zellen weist eine beträchtliche Anzahl von an Kalbsthymus-DNA bindenden Proteinen und Glykoproteinen auf. Ihr Molekulargewicht liegt im Bereich von ca. 15-150 kd. Abb. 15 stellt die Proteine dar, die mit steigender Salzkonzentration von nativer bzw. denaturierter DNA eluiert werden. Von der nativen DNA eluiert der grösste Teil der Proteine bei den Konzentrationen von 0,1 M, 0,15 M und 0,25 M NaCl (Abb. 15a, Bahnen 1-3). Mit 0,6 M NaCl eluieren nur noch wenige Proteine (Bahn 4). Im 2,0 M NaCl-Eluat lassen sich keine Proteine nachweisen. Von der denaturierten DNA eluieren die Proteine bei den Konzentrationen von 0,1 M bis 0,25 M NaCl (Abb. 15b). Im 0,6 M und 2,0 M NaCl-Eluat sind keine Proteine vorhanden. Sowohl bei den an nativer wie den an denaturierter DNA bindenden Proteinen finden sich solche, die nur bei einer bestimmten Salzkonzentration eluiert werden und solche, die mit steigender Salzkonzentration kontinuierlich eluiert werden. Abb. 6 zeigt, dass sowohl an nativer wie an denaturierter DNA rel. viele Glykoproteine gebunden werden.

Abb. 15. DNA-bindende Proteine des Cytosols. 10% SDS-Polyacrylamidgel, AS-CB-Färbung. a) an native DNA bindende Proteine, b) an denaturierte DNA bindende Proteine. Die Proteine werden bei folgenden Salzkonzentrationen eluiert: 0,1 M NaCl (1), 0,15 M NaCl (2), 0,25 M NaCl (3), 0,6 M NaCl (4).

Abb. 16. DNA-bindende Glykoproteine des Cytosols. 10% SDS-Polyacrylamidgel, Con A-Per-Färbung. a) an native DNA-bindende Glykoproteine, b) an denaturierte DNA bindende Glykoproteine. Die Proteine werden mit 2,0 M NaCl eluiert.

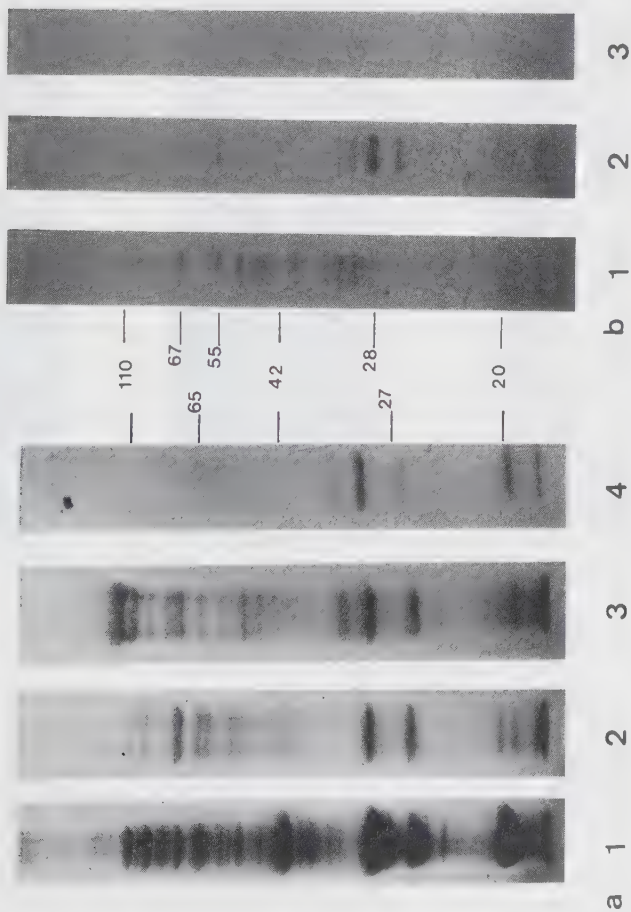
16

MW $\times 10^{-3}$



15

MW $\times 10^{-3}$



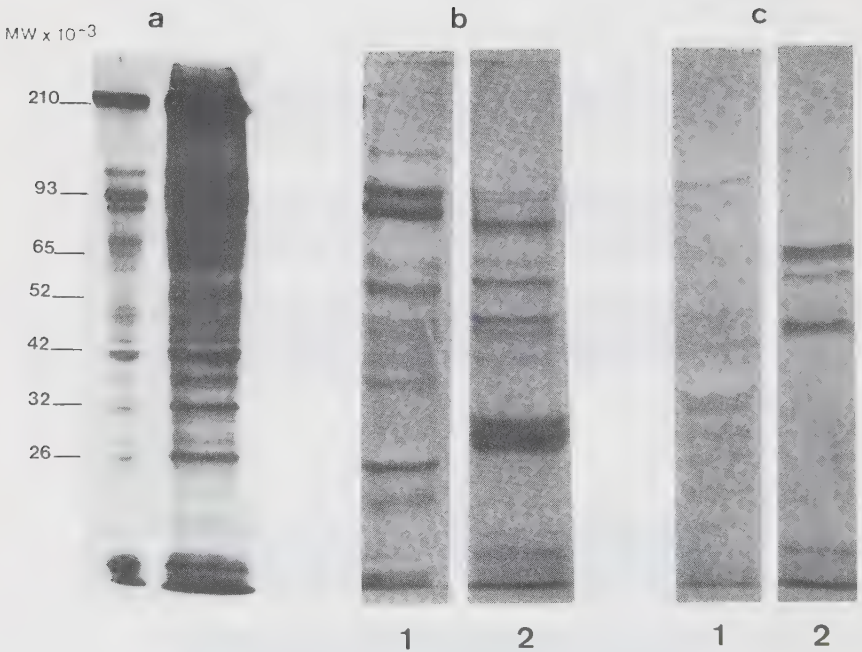


Abb. 17. DNA-bindende Kernproteine. Autoradiogramm eines 10% SDS-Polyacrylamidgels. a) Kontrolle= markiertes Kernhomogenat, b) an native und c) an denaturierte DNA bindende Kernproteine. Die gebundenen Proteine werden mit 0,15 M NaCl (1) und 2,0 M NaCl (2) eluiert.

3.7.2. DNA-bindende Proteine von Kernen

Die Affinität von NC-4-Kernproteinen zu Kalbsthymus-DNA wird mit radioaktiv markierten Kernproteinen untersucht. Dazu werden NC-4-Zellen während der Entwicklung von späten Aggregaten bis zu "fingers" mit ^{14}C -Acetat gefüttert und die isolierten Kerne zusammen mit stationären NC-4-Zellen als "Trägermaterial" aufgearbeitet. Die Elution der Proteine von den DNA-Säulen erfolgt mit 0,15 M und 2,0 M NaCl. Das Autoradiogramm der in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine zeigt, dass v.a. an doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA mehrere der im Kernhomogenat markierten Proteine binden (Abb. 17).

3.8. Synthese und Turnover von Kernproteinen während der Entwicklung

Synthese und Turnover der Kernproteine werden anhand des in vivo-Einbaus von ^{14}C -Acetat untersucht.

3.8.1. Stadienspezifische Proteinsynthese

Die stadienspezifische Synthese von Kernproteinen wird mit sogenannten Kurzzeitmarkierungen untersucht. Dazu werden Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien während zwei bis drei Stunden mit ^{14}C -Acetat gefüttert. Abb. 18 zeigt die Autoradiogramme der in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenate von zwei Versuchsserien. Die Resultate sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die im Verlaufe der Differenzierung am stärksten markierten Banden weisen Molekulargewichte von 280 kd, 210 kd, 93 kd, 89 kd, 65 kd, 52 kd, 47 kd, 45 kd, 42 kd, 32 kd, 27,5 kd und 26 kd auf.

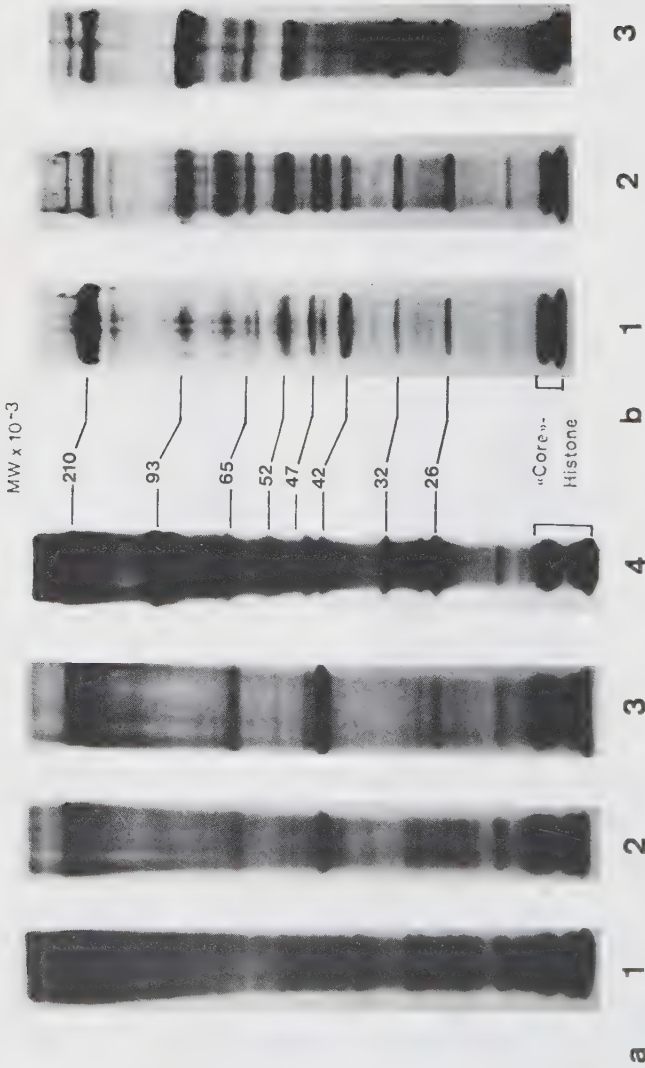


Abb. 18. Stadienspezifischer Einbau von ¹⁴C-Acetat in Kernproteine. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. In Abb. a werden die Zellen von t=0 bis Präaggregation (1), Präaggregation bis frühe Aggregation (2), frühe Aggregation bis Anfang "tip"-Bildung (3) und frühe "tips" bis frühe "slugs" (4) markiert; in Abb. b von Aggregation bis "tips" (1), "tips" bis "fingers" (2) und "fingers" bis anfangs Kulmination (3).

MG (kd)	Prä- aggregate	frühe Aggregate	Aggregate	frühe "tips"	"tips"	"fingers"	"slugs"	anfangs Kulmination
280								
210 (M.h.c.)								
170								
93								
89								
75								
72								
68								
65								
62								
54								
52								
47								
45								
42 (Actin)								
38								
36								
32								
27,5								
26								
25								
24								
23								
21								

*) nicht untersucht, ob frühe und späte Proteine identisch.

Tab. 1. Stadienspezifische Synthese der Kernproteine. Zusammenfassung von Abb. 18 a, b

Die meisten der in Aggregaten und späteren Stadien stark markierten Proteine werden vermutlich in geringer Konzentration auch in präaggregierten Zellen synthetisiert. Die Zunahme der Synthese erfolgt zur Hauptsache im Aggregat- bis "tip"-Stadium. Davon ausgenommen sind die Proteine von 280 kd, 65 kd, 38 kd, 36 kd, 32 kd und 27,5 kd. Deren Synthese steigt erst im "slug"-Stadium an. Viele Proteine, deren Synthese zwischen Aggregation und "tip"-Bildung ansteigt, werden auch in späteren Stadien, d.h. zwischen "finger" und Anfang Kulmination synthetisiert. Davon ausgenommen sind die Proteine von 170 kd, 68 kd, 62 kd, 47 kd, 45 kd, 42 kd, 23-25 kd und 21 kd. Die niedermolekularen Proteine von 21-25 kd werden nur zu Beginn der Differenzierung synthetisiert.

MG (kd)	Pra-aggregation	Aggregation	"fingers"	anfangs Kulmination	gleichzeitig Einbau von ¹⁴ C-Acetat
280					ja
210					nein
93					ja
92			*)		nein
89					ev
75-76					ev
68					ev
65					ev
61					nein
45					ja
42					nein
32					ja
29					nein
26					ja

*) ev. durch Bande von 93 kd überdeckt

Tab. 2. Stadienspezifischer Einbau von ¹⁴C-Glucosamin in Kernproteine. Vergleiche Abb. 19

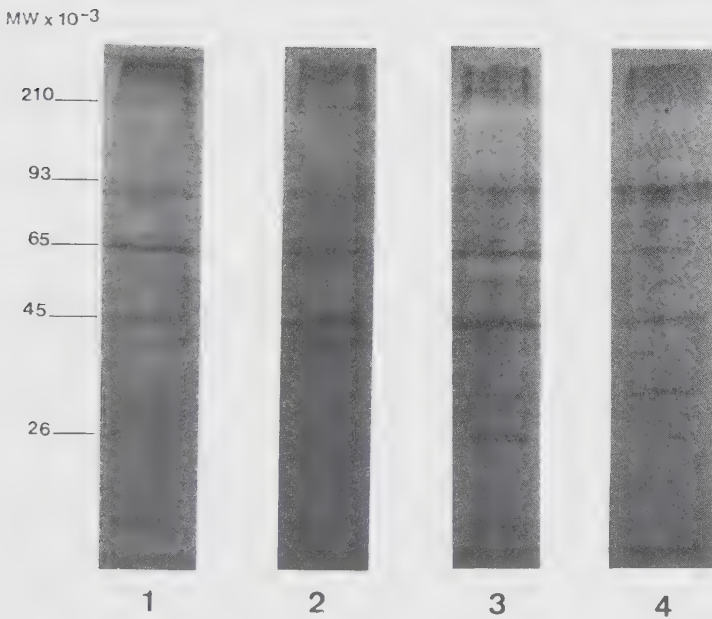


Abb. 19. Stadienspezifischer Einbau von ¹⁴C-Glucosamin. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. Die Zellen werden von t=0 bis Präaggregation (1), Präaggregation bis Aggregation (2), Aggregation bis "fingers" (3) und "fingers" bis anfangs Kulmination (4) markiert.

3.8.2. Stadienspezifische Synthese von Glykoproteinen

Die Synthese von Glykoproteinen wird anhand des in vivo-Einbaus von ^{14}C -Glucosamin in Kernproteine untersucht. Wie aus Abb. 19 und Tab. 2 ersichtlich, lassen sich ca. 14 Banden erkennen. Einige Proteine werden während des gesamten Entwicklungsabschnittes markiert, zum Teil in gleichbleibender Stärke (89 kd), zum Teil mit unterschiedlicher Aktivität in den einzelnen Stadien (45 kd, 65 kd). Die meisten Glykoproteine werden jedoch nur während bestimmter Stadien synthetisiert. Bei ungefähr der Hälfte der Banden ist der Einbau von Glucosamin zeitlich mit einer starken Neusynthese von Kernproteinen (Einbau von ^{14}C -Acetat) der entsprechenden apparenten Molekulargewichte korreliert (280 kd, 93 kd, 45 kd, 32 kd, 26 kd).

3.8.3. Turnover von Kernproteinen

Der Turnover von Kernproteinen wird anhand von Langzeitmarkierungen untersucht (Abb. 20 und Tab. 3). Die Kernproteine lassen sich nach ihrem Auftreten und Verschwinden in folgende Kategorien unterteilen: 1) Proteine, die zu Beginn der Differenzierung synthetisiert werden und bis zur Ausbildung des "mexican hat" markiert bleiben und auch bei Fütterung von bereits aggregierten Zellen mit ^{14}C -Acetat markiert werden, z.B. 116 kd. 2) Proteine, die sowohl bei früher wie bei später Markierung erst einige Zeit nach der Zugabe des Isotops, meist zwischen "tip" und "slug", im Kern erscheinen, z.B. 280 kd, 32 kd. 3) Proteine, die bei früher Markierung der Zellen synthetisiert werden und erhalten bleiben, aber bei Markierung von bereits aggregierten Zellen nicht mehr synthetisiert werden, z.B. 64 kd, 45 kd. 4) Proteine, die ebenfalls zu Beginn der Differenzierung synthetisiert werden, aber nur während kurzer Zeit erhalten bleiben, z.B. 43,5 kd, 49 kd. Einige Banden (mit *2 bezeichnet) sind zu Beginn der Differenzierung erkennbar, verschwinden dann und treten bei der Markierung von bereits aggregierten Zellen wieder auf. Es wurde nicht

untersucht, ob die frühen und späten Proteine identisch sind. Zu beachten ist allgemein, dass die Aktivität der stark markierten Proteine erhalten bleibt, z.B. 210 kd (Myosin h.c.), 170 kd, 62 kd, 42 kd (Actin).

3.8.4. Synthese und Turnover von Kernproteinen während der Reaggregation von desaggregierten Zellen

Aggregate und Pseudoplasmodien von Dd können zu Einzelzellen desaggregiert werden, indem die Aggregate oder Pseudoplasmodien in PDF-Puffer, enthaltend 10 mM EDTA, suspendiert und mehrmals durch eine Spritze getrieben werden. Bei anschliessendem Ausplattieren reaggregieren die Zellen in sehr kurzer Zeit (Newell et al., 1972). Werden z.B. "slugs" desaggregiert, so erfolgt die Neubildung von Aggregaten in ca. 1,5 Stunden, von "tips" in zwei und von "slugs" in 2,5 Stunden. Anhand von Desaggregations- und Reaggregationsexperimenten soll untersucht werden, 1) welche der synthetisierten Proteine erhalten bleiben bzw. abgebaut werden und 2) welche Proteine bei der Reaggregation wieder synthetisiert werden.

Abb. 21 zeigt die Autoradiogramme von Kernproteinen aus "tips": Die Kontrolle (Bahn 1) zeigt die Kernproteine von Zellen, die von $t=0$ bis "tips" mit ^{14}C -Acetat gefüttert werden. Bahn 2 zeigt die Kernproteine von Zellen, die nach der Markierung von $t=0$ bis "tips" desaggregiert und in Abwesenheit von ^{14}C -Acetat zu "tips" reaggregieren gelassen werden. Aus dem Vergleich der beiden Proben kann entnommen werden, dass im Verlaufe der Desaggregation und Reaggregation alle Proteine erhalten bleiben. Werden nicht markierte "tips" desaggregiert und in Gegenwart von ^{14}C -Acetat zu "tips" reaggregieren gelassen, so werden die in der Kontrolle am stärksten markierten Proteine entweder gar nicht mehr (42 kd, Actin) oder nur schwach (47 kd, 62 kd, 210 kd, Myosin h.c.) markiert. Die neu auftretenden Banden (Pfeile) entsprechen den bei Kurzzeitmarkierungen erst später, d.h. zwischen "tips" und

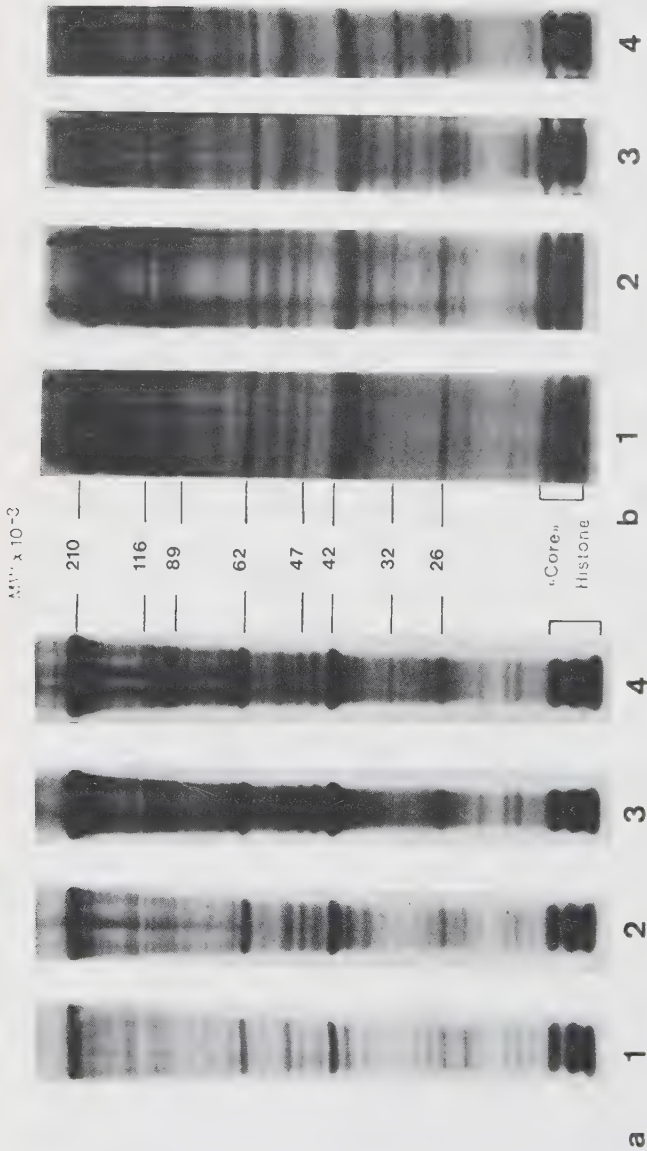


Abb. 20. Langzeitmarkierungen mit ^{14}C -Acetat. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. a) Die Zellen werden eine Stunde nach dem Ausplatten mit ^{14}C -Acetat gefüttert. Kerne werden isoliert aus frühen Aggregaten (1), Aggregaten (2), "tips" (3) und "slugs" (4). b) Bereits aggregierte Zellen werden mit ^{14}C -Acetat gefüttert. Kerne werden isoliert aus "tips" (1), "fingers" (2), "slugs" (3) und anfangs Kulmination (4).

MG (kd)	Zellen bei teilw mit ^{14}C -Acetat markiert und Kerne isoliert aus		Aggregierte Zellen mit ^{14}C -Acetat markiert und Kerne isoliert aus			
	frühen Aggregaten	Aggregaten	"tips"	"slugs"	"tips"	"fingers"
280						
210						
170						
116						
110						
100						
96						
93						
89						
86						
85						
78						
76						
67						
65						
64						
62						
54						
52						
50						
49						
48						
47						
45						
43,5						
42						
38						
37						
36						
35						
32						
29						
27,5						
26						
24						
23,5						
23						
21						
20						

*1) ev. durch breite Bande von 42 kd überdeckt

*2) nicht untersucht, ob frühe und späte Proteine identisch

Tab. 3. Langzeitmarkierungen mit ^{14}C -Acetat. Vergleiche Abb. 20

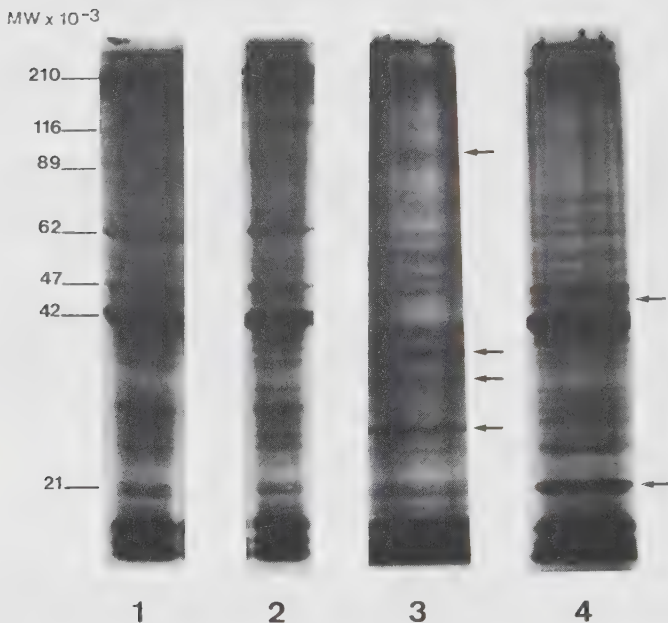


Abb. 21. Synthese und Turnover der Kernproteine von $t=0$ bis "tips" bei normaler Entwicklung, bei desaggregierten und bei suspendierten Zellen. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. 1) "tip"-Bildung erfolgt in Gegenwart von ^{14}C -Acetat (=Kontrolle) 2) In Gegenwart von ^{14}C -Acetat gebildete "tips" (entsprechend 1) werden desaggregiert. Die Reassoziatio erfolgt in Abwesenheit von ^{14}C -Acetat. 3) In Abwesenheit von ^{14}C -Acetat gebildete "tips" werden desaggregiert. Die Reassoziatio erfolgt in Gegenwart von ^{14}C -Acetat. 4) Stationäre Zellen werden in Gegenwart von ^{14}C -Acetat in Suspension gehalten (s. Text).

"fingers" (Abb. 18b) erscheinenden Proteinen. Da die Entwicklung von desaggregierten Zellen schneller verläuft und bei der Reaggregation auch kleinere Pseudoplasmodien entstehen, ist es relativ schwierig, genau definierte Stadien zu erfassen.

Abb. 21, Bahn 4 stellt die Kernproteine von stationären Zellen dar, die während einer dem Kontrollansatz (Bahn 1) entsprechenden Zeit in ^{14}C -Acetat enthaltendem PDF-Puffer mit 100 rpm geschüttelt werden, so dass kein Zell-Zell-Kontakt möglich ist. Unter diesen Bedingungen erfolgt keine der Differenzierung entsprechende Proteinsynthese. Einige Banden weisen der Kontrolle vergleichbare Aktivitäten auf, z.B. 38 kd, 42 kd (Actin), 45 kd, 47 kd. Andere Banden fehlen oder sind schwächer markiert, z.B. 116 kd, 89 kd, 62 kd. Die Bande von 21 kd wird bedeutend stärker markiert.

Mit den in Abb. 22 dargestellten Experimenten wird weiter untersucht, welche Proteine bei der Reaggregation von desaggregierten Zellen nochmals synthetisiert werden müssen. Dafür in Frage kommen diejenigen Proteine, die nur oder verstärkt in desaggregierten Zellen auftreten. In der Tab. 4 sind die Banden zusammengestellt, die in normal entwickelten und in desaggregierten Zellen unterschiedlich markiert sind. Erschwert wird die Auswertung wiederum dadurch, dass es relativ schwierig ist, genau vergleichbare Stadien zu erfassen. So entspricht die Probe von Abb. 22b, Bahn 2 sehr wahrscheinlich einem etwas weiter entwickelten Stadium als die entsprechende Kontrolle. Dies bedeutet, dass die stärkere Markierung der Banden von 91-93 kd, 89 kd und 38 kd nicht mit der Desaggregation und Reaggregation zusammenhängt.

Für die Fragestellung von Bedeutung sind jedoch die Proteine von 280 kd, 210 kd, 100 kd, 62 kd, 54 kd, 48 kd, 47 kd und 20-28 kd. Die Bande von 100 kd tritt nur nach der Desaggregation von "tips" und "fingers" auf und stellt ein neues Protein dar. Das Protein von 62 kd wird nach der Desaggregation immer

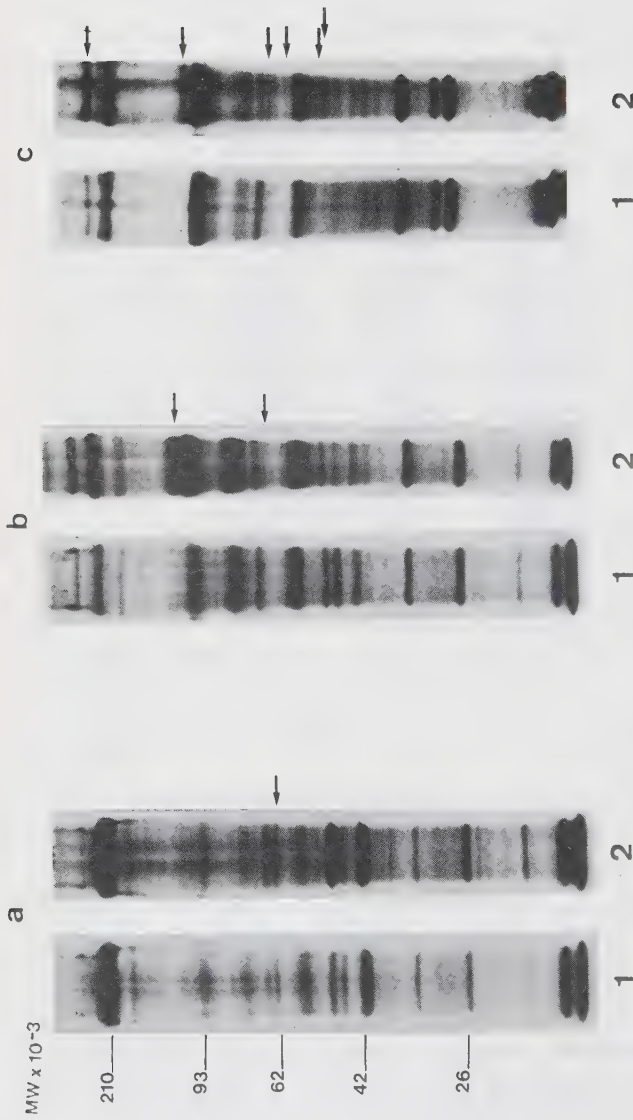


Abb. 22. Synthese von Kernproteinen bei Reaggregation von a) desaggregierten Aggregaten und Weiterentwicklung zu "tips", b) desaggregierten "tips" und Weiterentwicklung zu "fingers", c) desaggregierten "fingers" und Weiterentwicklung bis zu Beginn der Kulmination (Bahnen 2). Als Kontrollen (Bahnen 1) werden nicht desaggregierte Zellen mit ^{14}C -Acetat markiert, a) Aggregat bis "tips", b) "tips" bis "fingers", c) "fingers" bis anfangs Kulmination. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten.

synthetisiert. Die Proteine von 54 kd und 47 kd treten ebenfalls in allen desaggregierten Zellen auf, sind aber nur schwach markiert. Den Proteinen von 62 kd, 54 kd und 47 kd ist gemeinsam, dass sie nach der Desaggregation wieder synthetisiert werden, in Kurzzeitmarkierungen in relativ frühen Stadien auftreten und in späten Stadien nicht mehr synthetisiert werden, in Langzeitmarkierungen erhalten bleiben und dass sie keine Glykoproteine sind. Mehrere schwache Banden mit Molekulargewichten zwischen 20 und 25 kd sind in allen desaggregierten Zellen erkennbar. Es sind frühe Proteine, die in Langzeitmarkierungen nur zum Teil erhalten bleiben.

MG (kd)	a) Aggregate		b) "tips"		c) "slugs"	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
280	+	+	+	++	+	++
210	++	++	+	++	+	++
100	(+)	(+)	(+)	+	-	+
91+93 *1)	+	+	+	++	++	++
89	-	-	(+)	+	+	+
62	+	+	(+)	+	(+)	+
54	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+
48	-	-	-	+	-	+
47	+	++	+	+	-	+
38	(+)	(+)	(+)	+	+	+
22-25 *2)	(+)	+	(+)	+	(-)	+

*1) können bei starker Markierung nicht mehr unterschieden werden

*2) mehrere schwache Banden

Tab. 4. Unterschiede in der Proteinsynthese von desaggregierten (2) und nicht desaggregierten Zellen (1). Auswertung von Abb. 22

3.9. Phosphorylierung von Kernproteinen

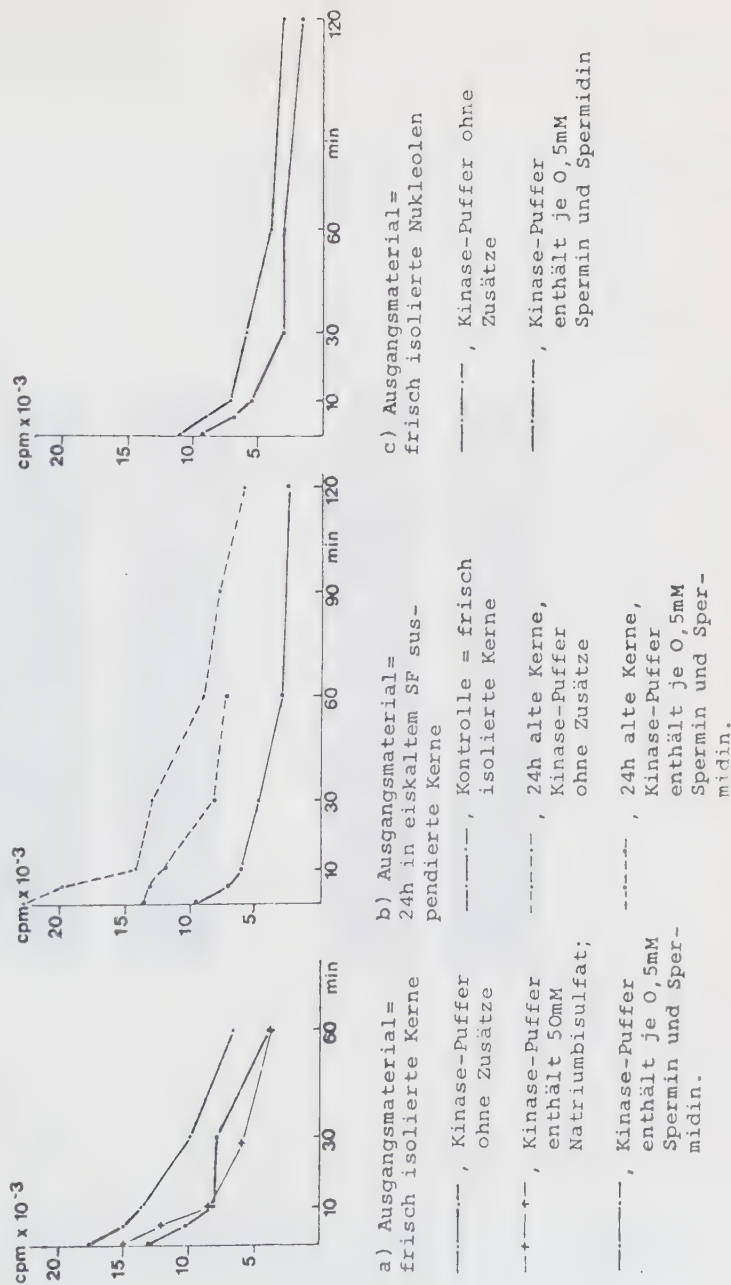
3.9.1. In vitro-Phosphorylierung der Kernproteine von stationären Ax-3-Zellen

Die Inkubation von isolierten Kernen in der Phosphorylierungsmischung führt zu einem sehr schnellen Phosphateinbau in säureunlösliches Material. Die höchste Aktivität wird nach einer Inkubationszeit von 1 min gemessen. Nach 60 min sinkt die Aktivität auf ca. 20% (Abb. 21a). Das Vorhandensein von 50 mM Natriumbisulfit, welches nach Gurley et al. (1978) die Phosphatase-Aktivität reduziert, bewirkt keine Änderung des Phosphateinbaus. In Gegenwart von je 0,5 mM Spermin und Spermidin wird der Anteil des eingebauten Phosphats um ca. 1/3 erhöht, der zeitliche Verlauf des Phosphateinbaus jedoch nicht verändert. Einen fast um die Hälfte erhöhten Einbau zeigen Kerne, welche vor der Inkubation 24 h in eiskaltem SF-Medium suspendiert gehalten werden (Abb. 23b). Bei solchen Kernen lässt sich durch Zugabe von je 0,5 mM Spermin und Spermidin der Einbau von markiertem Phosphat nochmals erhöhen.

Die Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernproteinen (Abb. 24a) zeigen, dass nahezu 30 verschiedene Proteine phosphoryliert werden. Besonders stark markiert werden die Proteine von 210 kd (Doppelbande), 82 kd, 40 kd, 37 kd und 26 kd. Nach 60 min Inkubationszeit (Bahn 2) verschwindet die Markierung von 5 Banden (150 kd, 125 kd, 105 kd, 46 kd und Histon-Proteine) praktisch vollständig, während die Markierung der übrigen Banden allgemein schwächer wird.

Die Phosphorylierung von Nukleolen ergibt ein den Kernen ähnliches Muster, sowohl in Bezug auf die Kinetik (Abb. 23c) wie auf die Autoradiogramme (Abb. 24b). In den Autoradiogrammen von während 1 min inkubierten Nukleolen sind die Banden von 210 kd und 58 kd schwächer markiert, und ein Protein von 21 kd wird spezifisch phosphoryliert. Bei einer Inkubation von 60 min werden die

Abb. 23. In vitro-Einbau von ^{32}P in TCA-unlösliches Kernmaterial. Inkubationsbedingungen, s. Material und Methoden



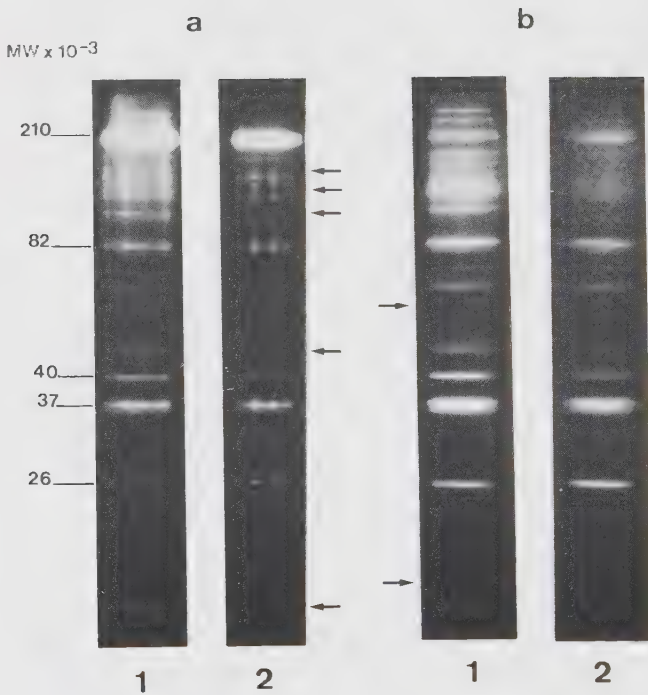


Abb. 24. In vitro ^{32}P -Einbau in Kerne und Nukleolen von Ax-3. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Homogenaten. a) Kerne, b) Nukleolen, (1) 1 min inkubiert, (2) 60 min inkubiert

gleichen Proteine wie in den Kernen und das Protein von 21 kd spezifisch dephosphoryliert.

Das Vorhandensein von Polyaminen in der Phosphorylierungsmischung lässt in den Autoradiogrammen sowohl von Kernen wie von Nukleolen keine Veränderungen erkennen (nicht gezeigt).

3.9.2. In vitro -Phosphorylierung der Kernproteine von NC-4 im Verlaufe der Differenzierung

Abb. 25 zeigt die Autoradiogramme der in vitro phosphorylierten Kernproteine von stationären Zellen (a), frühen Aggregaten (b), "tips" (c) und "slugs" (d). Bei einer Inkubationszeit von 1 min (Bahn 1) weisen Kerne von stationären NC-4-Zellen ein den Ax-3-Kernen (Abb. 23a, Bahn 1) sehr ähnliches Phosphorylierungsmuster auf. Allerdings ist in den NC-4-Kernen die Bande von 82 kd schwächer und diejenige von 57 kd stärker markiert.

Bei einer Inkubationszeit von 60 min (Bahn 2) sind auch bei NC-4 viele Proteine schwächer phosphoryliert. Die Aktivität einiger Proteine (26 kd, 37 kd, 50 kd) bleibt in ungefähr gleicher Stärke erhalten.

Mit fortschreitender Differenzierung werden immer weniger Proteine phosphoryliert, und die Aktivität der noch markierten Proteine sinkt von Stadium zu Stadium. Es treten auch keine neu markierten Proteine auf (s. auch Tab. 5). Im "slug"-Stadium lassen sich nach 1-minütiger Inkubation neben der Bande von 210 kd und der Histonbande nur noch drei sehr schwach markierte Banden erkennen. Werden die Kerne während 60 min inkubiert, so bleibt in "tips" und "slugs" nur noch die Bande von 210 kd markiert.

Die in vitro-Phosphorylierung der Kernproteine von stationären Zellen, Aggregaten, "tips" und "slugs" wird durch die Zugabe von cAMP bzw. cGMP (je 10^{-6} M) nicht beeinflusst (nur Inkubationen

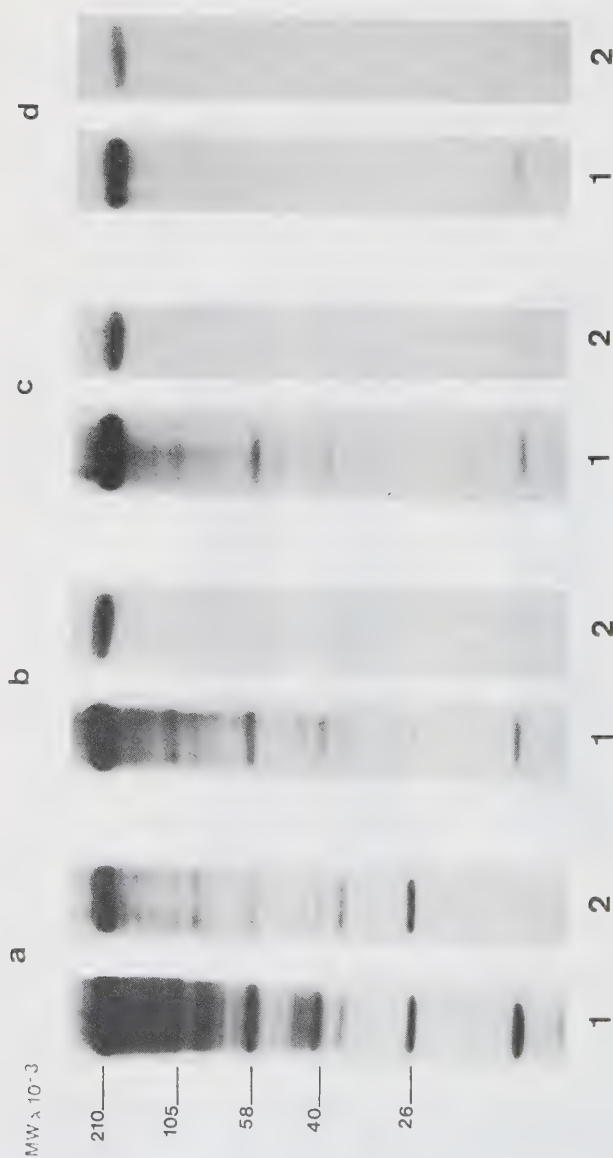


Abb. 25. In vitro-Phosphorylierung von NC-4-Kernen aus verschiedenen Differenzierungsstadien. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. a) stationäre Zellen, b) frühe Aggregate, c) "tips", d) "slugs"; (1) 1 min inkubiert, (2) 60 min inkubiert

von 5 min Dauer untersucht; Resultate nicht gezeigt).

MG (kd)	stationäre Zellen	frühe Aggregate	"tips"	"slugs"
280				
210				
170				
150				
140				
130				
125				
120				
112				
108				
105				
91				
82				
78				
75				
70				
65				
60				
54				
50				
48				
46				
44				
40				
37				
35				
26				
HP*)				

*) Histonproteine

Tab. 5. In vitro-Phosphorylierung der Kernproteine von NC-4 während der Differenzierung. Vergleiche Abb. 25, Bahnen 1

3.9.3. In v i v o -Phosphorylierung der Kernproteine von NC-4 während der Differenzierung

Die in vivo-Phosphorylierung der Kernproteine wird anhand des Einbaus von anorganischem ^{32}P -Phosphat während der Differenzierung von NC-4-Zellen untersucht. Ein Einbau von $^{32}\text{P}_i$ wird nur erreicht, wenn die Zellen in nicht-phosphathaltigem Puffer ausgeplattet werden. Die isolierten Kerne werden in 10%-SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach der Elektrophorese werden die Gele während 15 min mit heisser 5% TCA (90°C) behandelt, um mit Proteinen migrierende Nukleinsäuren zu hydrolysieren (Bhorjee & Pederson, 1976). Diese Behandlung hat auf die AS-CB-Färbung der Proteine keinen Einfluss. Dagegen treten im Autoradiogramm deutliche Unterschiede auf. Im folgenden (Abb. 26) werden nur

MG (kd)	Präaggregate	Aggregate	"tips"	anfangs Kulmination
280				
210				
170				
130				
120				
100				
93				
85				
76				
75				
67				
58				
55				
49				
47				
43				
40				
36				
26				
21				
HP				

Tab. 6. In vivo-Einbau von $^{32}\text{P}_i$ in Kernproteine von NC-4. Die Markierung der Zellen erfolgt bei $t=0\text{h}$. Vergleiche Abb. 26

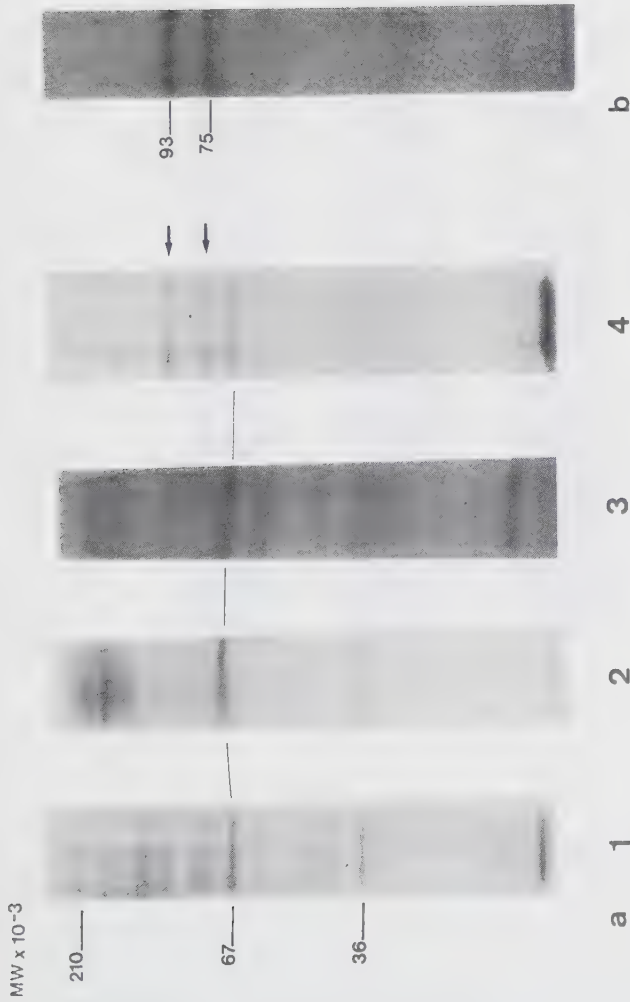


Abb. 26. In vivo -Einbau von $^{32}\text{P}_i$ in Kernproteine von NC-4. Autoradiogramme von in 10% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Kernhomogenaten. a) Die Zellen werden zur Zeit $t=0$ mit $^{32}\text{P}_i$ gefüttert. Kerne werden isoliert aus Präaggregaten (1), Aggregaten (2), "tips" (3) und anfangs Kulmination (4). b) Die Zellen werden zwischen "tip"- und "slug"-Stadium mit $^{32}\text{P}_i$ markiert

Autoradiogramme von TCA-behandelten Gelen gezeigt.

Langzeitmarkierungen, bei denen die Zellen zur Zeit $t=0$ mit anorganischem Phosphat markiert werden, zeigen, dass zu Beginn der Differenzierung (Präaggregation und Aggregation) ca. 20 Proteine phosphoryliert werden (s. auch Tab. 6). Starke Aktivitäten weisen aber nur die Banden von 67 kd, 36 kd und die Histonbande auf. Zu Beginn der Kulmination (Bahn 4) sind von den anfangs vorhandenen Markierungen nur noch wenige erhalten. Neu sind die Proteine von 93 kd und 75 kd phosphoryliert. Diese beiden Proteine werden auch bei einer sogenannten Kurzzeitmarkierung von "tips" bis "slugs" phosphoryliert (Bahn 5). Werden nicht markierte "tips" zu Einzelzellen desaggregiert und in Gegenwart von $^{32}\text{P}_i$ zu "slugs" entwickeln gelassen, werden ebenfalls nur die Proteine von 93 kd und 75 kd phosphoryliert (nicht gezeigt).

Vergleich der in vivo- und in vitro-Phosphorylierungen: Zu Beginn der Entwicklung werden sowohl in vivo wie in vitro relativ viele Proteine phosphoryliert. Mit fortschreitender Entwicklung verschwinden diese Phosphatgruppen, bzw. werden die entsprechenden Proteine nicht mehr phosphoryliert. Während in vivo zwischen "tip"- und "slug"-Stadium zwei neue Proteine phosphoryliert werden, treten in vitro keine neu markierten Proteine auf. Mehrere Proteine werden sowohl in vivo wie in vitro phosphoryliert (z.B. 210 kd, 170 kd), andere werden nur in vivo (z.B. 21 kd, 55 kd) bzw. nur in vitro (z.B. 105 kd, 112 kd) phosphoryliert.

3.9.4. In vitro-Phosphorylierung in Gegenwart von 0,15 M NaCl und Löslichkeit der Phosphoproteine in 0,15 M NaCl (Abb. 27)

Enthält der Phosphokinase-Ansatz 0,15 M NaCl, so werden die Proteine von 44 kd, 46 kd und 60 kd stärker, die Proteine von



Abb. 27. Phosphorylierung der Kernproteine von Stamm NC-4 in Gegenwart von 0,15 M NaCl und Löslichkeit der Phosphoproteine in 0,15 M NaCl. Autoradiogramme von 10% SDS-Polyacrylamidgelen. 1) Kerne werden ohne NaCl phosphoryliert; 2) Kerne werden in Gegenwart von 0,15 M NaCl phosphoryliert; 3) 1'000 g Ueberstand von in 0,15 M NaCl phosphorylierten Kernen; 4) 1'000 g Sediment von in 0,15 M NaCl phosphorylierten Kernen

26 kd und 82 kd schwächer markiert als im Kontrollansatz ohne NaCl (Bahnen 1 und 2). Zudem werden mehrere niedermolekulare Proteine von 20-36 kd, welche im Kontrollansatz nicht phosphoryliert werden, in 0,15 M NaCl schwach markiert. Der Grossteil der phosphorylierten Proteine lässt sich sowohl im 0,15 M NaCl-Extrakt (Bahn 3) wie in der in 0,15 M NaCl unlöslichen Fraktion nachweisen (Bahn 4). Einige niedermolekulare Phosphoproteine (20-25 kd, 28 kd) finden sich nur im NaCl-Ueberstand. Die Phosphoproteine von 42 kd (offensichtlich nicht Actin) und 36 kd und die phosphorylierte Histonbarde sind nur in der NaCl-unlöslichen Fraktion erkennbar.

4. Diskussion

Die Diskussion wird in zwei Hauptabschnitte unterteilt. Als erstes wird die Extraktion der NH-Proteine und deren Lokalisierung im Kern besprochen. Der zweite Teil befasst sich mit der Synthese und Phosphorylierung von NH-Proteinen während der Differenzierung.

4.1. Extraktion und Lokalisierung der NH-Proteine im Kern

Kerne von *Dictyostelium discoideum* weisen eine grosse Zahl von NH-Proteinen auf. In eindimensionalen Gelen lassen sich rund 70 Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 kd und 280 kd feststellen. (Abb. 2). Die Anzahl könnte aber um einiges höher sein, da Proteine mit gleichen Molekulargewichten oder solche, die nur in sehr geringer Konzentration vorkommen, nicht nachweisbar sind. Nur wenige Kernproteine konnten identifiziert werden, so die Histone, Actin und Myosin. Die übrigen Proteine sind nicht bekannt. Man nimmt aber an, dass sie aus der nukleären Matrix (in welcher vermutlich die Chromosomen eingebettet sind), aus der Membran oder aus RNP-Partikeln stammen oder direkt mit der DNA assoziiert sind. Enzyme wie RNA- und DNA-Polymerasen liegen auch "gelöst" im Kern vor.

Im Versuch, verschiedene Klassen von NH-Proteinen zu erfassen, ging ich auf verschiedene Arten vor. Als erstes untersuchte ich die Extrahierbarkeit der NH-Proteine. Von Proteinen, welche nicht direkt an der Genregulation beteiligt sind (z.B. an RNA gebundene Proteine), könnte angenommen werden, dass sie relativ leicht befreit werden. Andererseits zeigen Pederson & Bhoree (1975), dass sich fest gebundene Proteine in der inaktiven Chromatin-Fraktion von Hela-Zellen befinden. Sie vermuten, dass diese Proteine die Transkription hemmen. Eine Schwierigkeit solcher Untersuchungen ist allerdings, dass viele Proteine sowohl fest an DNA gebunden, wie auch leicht löslich im Kern vorkommen.

Im weiteren wurden verschiedene Fraktionen des Kernes, wie Membranen, Chromatin, Nukleolen und Nukleosomen isoliert und deren Proteine untersucht. Im Idealfall hätten dabei einzelne Gene isoliert und die damit im aktiven und inaktiven Zustand assoziierten Proteine verglichen werden können. Dazu existieren aber keine geeigneten Methoden. Eine mögliche Ausnahme bilden die ribosomalen Gene. Aus *Physarum* konnten die Mini-Chromosomen, welche diese Gene und deren Spacer-Regionen enthalten, isoliert werden (Seebeck et al., 1979). Daher war ich auch interessiert, die Nukleolen-Proteine mit den gesamten Kernproteinen zu vergleichen. Als drittes versuchte ich mittels DNA-Affinitätschromatographie an native (doppelsträngige) und an denaturierte (einzelnsträngige) DNA bindende Proteine zu isolieren.

Als eine Möglichkeit zur Fraktionierung der Kernproteine untersuchte ich ihre differentielle Löslichkeit in 0,15 M NaCl, 0,25 N HCl, Puffer-gesättigtem Phenol und heissem SDS. Wie LeSturgeon & Rusch (1973) zeigen, lassen sich mit diesem Vorgehen die Kernproteine des azellulären Schleimpilzes *Physarum polycephalum* in vier Klassen unterteilen. So enthält die NaCl-Fraktion nur wenige Proteine, und deren Molekulargewichte sind zum grössten Teil geringer als 55 kd. Die HCl-Fraktion enthält nur Histone und einige andere niedermolekulare Proteine. Am meisten Proteine, mit Molekulargewichten zwischen 20 kd und 200 kd, finden sich in der Phenol-Fraktion. Die Fraktion der restlichen Proteine enthält wiederum relativ wenige, eher hochmolekulare Proteine. Eine solchermassen klare Fraktionierung der Kernproteine wird mit dieser Methode bei *Dd* nicht erreicht (Abb. 4). Wohl reichern sich einige Proteine in einer oder mehreren Fraktionen an. Doch mit Ausnahme der Histone sind praktisch alle Proteine in allen vier Fraktionen enthalten. So erscheinen z.B. die meisten der in 0,15 M NaCl löslichen Proteine, d.h. die sogenannten leichtlöslichen Proteine, auch in den Fraktionen der fester gebundenen Proteine. Auffallend ist die Bande von 42 kd (Actin). Sie stellt in allen vier Fraktionen eine Hauptkomponente dar.

Eine weitere Möglichkeit, die Kernproteine von Dd zu fraktionieren, bot die Chromatin-Präparation. Dies ist nach Bonner et al. (1968) die Gewinnung eines gelatinösen, homogenen, im Lichtmikroskop nicht strukturierten Materials. Ein solches Chromatin erhalten wir aus Dd nur, wenn die Kerne schonend lysiert werden; d.h. indem die Kerne wiederholt in dest. Wasser suspendiert und durch eine Pasteur-Pipette getrieben werden. Nach diesem Verfahren kann das resultierende Chromatin zusätzlich definiert werden als die Fraktion, die keine leicht löslichen Proteine mehr enthält. Als wichtiges Kriterium erachte ich auch, dass in dieser Proteinfraktion die Histone erhalten bleiben (Abb. 5, Bahn 4). Die Analyse der durch micrococcale Nuklease-Verdauung entstehenden DNA-Fragmente zeigt, dass solchermassen isoliertes Chromatin in nativem Zustand erhalten bleibt (persönliche Mitteilung von Fuhrer-Krüsi).

Wie Abb. 5 zeigt, weist Chromatin, welches nach der beschriebenen Methode isoliert wird, ein komplexes Proteinmuster auf. Es unterscheidet sich quantitativ deutlich von jenem von Kernhomogenaten. Die Histone stellen die Hauptkomponenten dar, während die übrigen Kernproteine in nur geringen Konzentrationen vorliegen. Im Gegensatz dazu lässt sich eine Chromatin-Präparation nach Pederson (1977) kaum vom Kernhomogenat unterscheiden. Er schreibt auch, dass Actin und Myosin 35% der Nichthistonchromatin-Proteine ausmachen. Die entsprechenden Banden von 210 kd und 42 kd treten in unsern Kernhomogenaten ebenfalls als Hauptbanden auf. Im Chromatin hingegen bilden diese Proteine nur noch einen geringen Anteil.

Ein unserer Chromatin-Präparation vergleichbares Verfahren wendeten Comings & Harris (1976) an. Sie fraktionieren die Kernproteine von Mäuseleber durch schrittweises Extrahieren mit 0,075 M NaCl - 0,025 M EDTA, verdünntem Puffer und 0,35 M NaCl. Im Verlaufe dieser Behandlung werden v.a. NH-Proteine freigesetzt. Im ersten Extraktionsschritt fallen besonders viel Actin und Myosin an. In den folgenden Schritten bilden diese Proteine nur noch

einen geringen Anteil. Die Zusammensetzung der übrigen, in den einzelnen Extraktionsschritten freigesetzten Proteine, verändert sich kaum. Comings & Harris vermuten deshalb, dass Actin und Myosin nicht Kernproteine sondern cytoplasmatische Verunreinigungen darstellen. Bei Dd dagegen finden sich Actin und Myosin in allen Extraktionsschritten in vergleichbaren Mengen, und ich vermute demzufolge, dass sie echte Kernproteine darstellen.

Die Isolierung von Nukleolen ermöglicht eine Anreicherung des die ribosomalen Gene enthaltenden Chromatins. Die von Pederson (1977) beschriebene Methode zur Isolierung von Nukleolen aus Kernen von Dd erwies sich als unbefriedigend. Beim Aufschliessen der Kerne mit Ultraschall verklebten die Nukleolen entweder mit Chromatin zu Klumpen oder wurden zertrümmert. Aehnliche Resultate zeitigte auch das Aufschliessen der Kerne in der "French Press". Eine gute Trennung und Anreicherung wird jedoch durch das Aufschliessen im Omnimixer erreicht, wenn von Kernen im Zell-Lysat ausgegangen wird, wie dieses bei der Kernisolation entsteht. Leider eignet sich dieses Vorgehen nur zur Isolation von Nukleolen aus Ax-3-Zellen. Die kleineren und kompakteren Kerne von NC-4 lassen sich damit nicht befriedigend aufschliessen.

Ueberraschenderweise unterscheiden sich bei der Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen die Proteinmuster von Nukleolen- und Kernhomogenaten nicht. Hingegen zeigen die Resultate der "Chromatin"-Präparation und der Verdauung mit micrococcaler Nuklease, dass v.a. die Histone in den Nukleolen weniger fest an die DNA gebunden sind. So enthält das wasserunlösliche Restsediment von Nukleolen (Abb. 7b, Bahn 7) praktisch keine Histone mehr. Die "Chromatin"-Behandlung von Nukleolen führt auch nie zu einem gelatinösen Sediment. Dies lässt ebenfalls auf eine andere, nicht dem Chromatin entsprechende Protein-DNA-Interaktion schliessen.

Eine spezifische Gruppe von NH-Proteinen findet sich in der Kernmembran. Die Isolierung mittels Heparin- und DNase I-Behandlung ergibt Kernmembranen, die (1) im Lichtmikroskop als Kernhüllen erkennbar sind, (2) im Saccharosegradienten zwischen 1,5 und 1,8 M Saccharose angereichert werden (Harris, 1978), (3) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Doppelmembranen und Kernporenkomplexe erkennen lassen (Abb. 11), (4) keine Histone aufweisen (Franke et al., 1976), (5) viele Glykoproteine enthalten.

Als ungeeignet zur Isolierung von Kernmembranen aus Dd erwiesen sich Methoden, nach welchen der Zellinhalt durch Behandlung mit hoher Salzkonzentration (Franke, 1974; Philipp et al., 1976) und/oder DNase I solubilisiert wird (Jackson, 1976; Harris, 1978). Diese Methoden ergaben in den meisten Fällen ein Produkt, das ähnlich wie ganze Kerne sedimentierte und auch praktisch das gleiche Proteinmuster aufwies. Ebenso wenig liessen sich die Methoden von Berezney & Coffey (1974) oder Herlan & Wunderlich (1976) zur Isolierung einer nukleären Protein-Matrix für Dd anwenden. In beiden Fällen zeigte das der nukleären Proteinmatrix entsprechende Produkt den Histongehalt von Kernen, während nach den erwähnten Autoren die nukleäre Protein-Matrix sowohl von Makrokernen von Tetrahymena wie von Rattenleberkernen praktisch keine Histone mehr enthält.

Wie die Untersuchung der Kernmembran von Dd im Elektronenmikroskop zeigt, weist diese grosse Aehnlichkeit mit den Kernmembranen höherer Eukaryonten auf.

Der Vergleich der AS-CB-Färbung und der Con A-Per-Färbung (Abb. 14 a,c) ergibt, dass die mit AS-CB nachweisbaren Proteine nur einen geringen Anteil der tatsächlich in der Kernmembran enthaltenen Proteine ausmachen. Einen im Vergleich zu Kernhomogenaten ebenfalls deutlich erhöhten Gehalt an Glykoproteinen finden Franke et al. (1976) in Kernmembranen von Rattenleber. Auf Grund von Con A-Bindungsstudien an isolierten Kernmembranen vermuten sie, dass sich der Hauptanteil der Zuckerreste an den luminalen,

d.h. gegeneinander ausgerichteten Oberflächen des Doppelmembransystems befindet. Die im Kernhomogenat von Dd nachweisbaren Glykoproteine sind vermutlich zum grossen Teil Bestandteile der Kernmembran. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass sich in der Chromatinfraction nur zwei Glykoproteine nachweisen lassen.

Betreffend Enzymaktivitäten von isolierten Kernmembranen liegen von verschiedenen Arbeitsgruppen Resultate über verschiedene Organismen vor (Review von Harris, 1978). Eigentliche Leitenzyme für Kernmembranen sind nicht bekannt (Monneron & d'Alayer, 1978). Doch wird in fast allen diesbezüglichen Arbeiten nebst anderen Phosphatasen v.a. eine Mg^{++} -stimulierte ATP'ase gezeigt (z.B. Sikstrom et al., 1976; Philipp et al., 1976). Häufig nachgewiesen werden auch Glucose-6-Phosphatase (z.B. Kay et al., 1972; Sikstrom et al., 1976) und NADH- und NADPH-Cytochrom c-Reduktase (z.B. Kay et al., 1972; Philipp et al., 1976; Sikstrom et al., 1976). Keines dieser Enzyme lässt sich jedoch in gereinigten Kernmembranen von Dd nachweisen. Es ist nicht auszuschliessen, dass ev. in der Kernmembran vorhandene Enzyme während der relativ lange dauernden Isolierung inaktiviert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass isolierte Plasma-Membranen von Dd nach einer Heparin-Behandlung, wie sie zur Isolierung von Kernmembranen angewendet wird, ihre Enzym-Aktivitäten beibehalten.

Mit dem Verfahren, Proteine auf Grund ihrer spezifischen Affinität zu DNA anzureichern, besteht die Möglichkeit, Proteine zu erkennen, die in vivo an Chromatin oder an DNA binden oder damit interagieren. Dafür in Frage kommen Proteine von struktureller, enzymatischer und regulatorischer Bedeutung. So beschreiben z.B. Allfrey et al. (1975) Proteine von Kalbsthymus-Kernen, die selektiv nur an "single copy" bzw. reiterierte DNA-Sequenzen oder nur an native bzw. denaturierte DNA binden. Schaller et al. (1972) beschreiben die präparative Reinigung mehrerer an Nukleinsäure-Synthese und -Prozessierung beteiligter Enzyme von E. coli über Säulen von an Agarose gebundener denaturierter DNA. Von mehreren Arbeitsgruppen wird ein an einzelsträngige DNA

bindendes Protein beschrieben, welches doppelsträngige DNA zu denaturieren, d.h. "entwinden" vermag (Hung & Lee, 1976; Thomas & Paul, 1976) und in einem Fall auch die "Reverse-Transcriptase" stimuliert (Hung & Lee, 1976). Stein (1975) zeigt, dass das Muster der an native Kalbsthymus-DNA bindenden Proteine von jungen und alten Fibroblasten spezifische Unterschiede aufweist. Ebenso beschreiben Finkelstein & Butow (1976), dass die Zusammensetzung der an nativer DNA bindenden Proteine von Hefe vom physiologischen Zustand der Zellen abhängt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass relativ viele cytoplasmatische Proteine von Dd an native und denaturierte Kalbsthymus-DNA binden. Die Auftrennung in Polyacrylamidgelen ergibt eine unterschiedliche Zusammensetzung für die an doppel- bzw. einzelsträngige DNA bindenden Proteine (Abb. 15). Die an native DNA bindenden Proteine weisen eine komplexere Zusammensetzung und zum Teil auch eine höhere Affinität zur DNA auf als die an einzelsträngige DNA bindenden Proteine. Unterschiedliche Gruppen von an nativer bzw. denaturierter DNA bindenden cytoplasmatischen Proteinen beschreibt Magun (1976) auch für den azellulären Schleimpilz *Physarum polycephalum*. Die Gruppen der DNA-bindenden Proteine der beiden Organismen zeigen jedoch verschiedene Eigenschaften: Bei *Physarum polycephalum* unterscheidet sich die Zahl der an doppel- bzw. einzelsträngiger DNA bindenden Proteine wenig, und während von den an einzelsträngige DNA bindenden Proteinen von Dd bereits in 0,25 M NaCl alle Proteine eluieren, geschieht dies bei *Physarum polycephalum* erst in 2,0 M NaCl.

Ueberraschend ist das Ergebnis der Con A-Peroxidase-Färbung (Abb. 16): Sowohl an doppelsträngiger wie an einzelsträngiger DNA binden viele cytoplasmatische Glykoproteine. Welche Bedeutung der Bindung von Glykoproteinen an DNA in vivo zukommt, ist umstritten. In Kernhomogenaten von Dd lassen sich wohl mehrere Glykoproteine nachweisen. Auf Grund der Analyse der Kernmembranproteine und der chromosomalen Proteine vermute ich aber, dass der grösste Teil der in Kernhomogenaten nachweisbaren Glykopro-

teine aus der Kernmembran stammt. Stein et al. (1975) finden zwar nach Markierung von HeLa-Zellen mit radioaktiven Zuckern im isolierten Chromatin mehrere Glykoproteine. Ebenso weisen Rizzo & Bustin (1977) in gereinigtem Chromatin aus Rattenleber Con A-bindende Proteine nach. Zu beachten ist auch, dass während der Entwicklung von Dd im Kernhomogenat neue Glykoproteine erscheinen (Abb. 19).

Um die Bindung von Kernproteinen von Dd an Kalbsthymus-DNA zu untersuchen, wurden radioaktiv markierte Kerne zusammen mit nicht markierten Zellen (=Trägermaterial) verarbeitet. Abb. 17 zeigt, dass sehr wenig Kernproteine binden. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Die zur Proteinaufarbeitung verwendete Methode könnte ungeeignet sein, insofern als die Kernproteine, die an DNA binden, in 1,7 M NaCl nicht löslich sind, oder die im NaCl gelösten Proteine aggregieren während der Dialyse zur Erniedrigung der Salzkonzentration und fallen aus. Ebenso könnten nur wenige der während der Entwicklung von Dd synthetisierten Kernproteine Affinität zu Kalbsthymus-DNA aufweisen.

Allgemeines: Die Extraktion der NH-Proteine aus Kernen unter Verwendung von Salz, Säure und Phenol erwies sich überraschenderweise als unspezifisch. Hingegen liess sich der Hauptteil der NH-Proteine mittels NaCl- und Wasser-Extraktion entfernen (Verfahren zur Chromatin-Präparation). Im verbleibenden Material blieben sowohl die Histone und die nukleosomale Struktur erhalten. Viele NH-Proteine wurden freigesetzt, und die verbleibenden sind vermutlich fest an DNA gebunden. Aber auch von letzteren wird ein Teil durch die Salz/Wasser-Behandlung freigesetzt.

Zwischen den Nukleolen-Proteinen und den Proteinen von ganzen Kernen treten keine signifikanten Unterschiede auf. Hingegen lassen sich unterschiedliche Affinitäten zwischen DNA und Proteinen beobachten. Die Histone von Nukleolen gehen sowohl während der Salz/Wasser-Behandlung wie während der Präparation von DNP-Partikeln verloren. Andererseits ist eine Anzahl von NH-Pro-

teinen stärker mit den Nukleolen assoziiert. Demzufolge unterscheiden sich Mono- und Dinukleosomen aus Nukleolen und ganzen Kernen auch in ihrer Proteinzusammensetzung. Die Tatsache, dass NH-Proteine auch nach dem Freisetzen des Grossteils der Histone mit den Nukleosomen assoziiert bleiben, deutet darauf hin, dass erstere direkt an DNA gebunden sind.

Die Verdauung mit micrococcaler Nuklease weist darauf hin, dass das Nukleolen-Chromatin eine eigene Struktur hat. Wenn dies durch das Vorhandensein von spezifischen Proteinen bedingt ist, sind es nur wenige, oder diese treten in relativ geringen Konzentrationen auf. Ebenso können sekundäre Modifikationen daran beteiligt sein. Ein Phosphoprotein mit niederem Molekulargewicht fand sich auch spezifisch in Nukleolen (s.später).

Zur Aktivierung der Gene könnte eine bestimmte Gruppe von Proteinen nötig sein. Solche Proteine würden, da Nukleolen einen hohen Prozentsatz an aktiven Genen vorweisen, vermutlich in Nukleolen in erhöhter Konzentration vorliegen (gebunden an nukleäre DNA). Dafür in Frage kämen v.a. die Proteine von 67 kd, 61 kd, 49 kd (Abb. 7 b, Bahn 7).

Die Kerne von Dd weisen eine unerwartet hohe Zahl von Glykoproteinen auf. Der grösste Teil befindet sich in der Kernmembran. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass Membranproteine direkt an der Genregulation beteiligt sind. Doch zeigten Rizzo & Bustin (1977), dass Con A spezifisch an drei NH-Proteine von Rattenleber-Chromatin bindet. Ebenso fanden Kurth et al. (1979), dass Con A an Puffs von polytären Chromosomen bindet.

Die Anwendung der Affinitätschromatographie mit nicht-homologer DNA zur Isolierung spezifischer Klassen von NH-Proteinen ist eher kritisch zu bewerten. Dies hauptsächlich, weil so viele Glykoproteine sowohl an doppel- wie an einzelsträngige DNA binden.

4.2. Synthese und Phosphorylierung von NH-Proteinen während der Differenzierung

4.2.1. Synthese

Die Synthese der NH-Proteine untersuchte ich mittels ^{14}C -Acetat- und ^{14}C -Glucosamin-Markierung. Es sollte gezeigt werden, ob die Synthese bestimmter Proteine in spezifischen Stadien erfolgt. Langzeitmarkierungen wurden gemacht, um festzustellen, ob die Konzentration von neu synthetisierten Proteinen abfällt, wenn deren Synthese aufgehört hat. Von regulatorischen Proteinen z.B. könnte angenommen werden, dass sie eine relativ hohe Umsatzrate (turnover) aufweisen. Kulturen von Dd können während der Entwicklung desaggregiert werden, und die Zellen sind fähig, während eines Bruchteils der ursprünglichen Zeit die gleiche Folge der morphologischen Änderungen nochmals zu durchlaufen (Newell et al., 1971 und 1972). Die mit bestimmten Entwicklungsstadien korrelierte Anreicherung von Enzymen (Newell et al., 1971 und 1972) und Synthese von Plasmamembran-Proteinen (Parish & Schmidlin, 1979 b) werden während der Redifferenzierung wiederholt. Dabei wird unabhängig von der zum Zeitpunkt der Desaggregation vorhandenen Menge dieser Enzyme das gesamte Quantum wieder synthetisiert. Eine Erklärung ist, dass desaggregierte Zellen bereits vorhandene Transkriptionsprodukte nicht verwenden können, und dass deshalb bei der Reaggregation das ganze Transkriptionsprogramm, gefolgt von schneller Translation, nochmals abläuft. Demzufolge wurde auch die Synthese der NH-Proteine während der Reaggregation untersucht.

Kurz- und Langzeitmarkierungen der NH-Proteine während der Entwicklung:

In Tab. 7 werden die wichtigsten Ergebnisse der Markierungsexperimente mit ^{14}C -Acetat und ^{14}C -Glucosamin zusammengefasst. Rund 14 Proteine zeigen im untersuchten Entwicklungsabschnitt über kürzere oder längere Zeit einen starken Einbau von ^{14}C -Acetat. Die gesamte Zahl der Kernproteine, deren Synthese von

MG (kd)	starke Markierung mit ¹⁴ C-Acetat	gleichzeitig Einbau von ¹⁴ C-Glucosamin	Synthesekativitäten					Neusynthese bei der Reasso- zierung von desaggregierten	
			Präaggregat	Aggregat	"tips"	"slugs"	anfangs Kulmination	Aggregaten	"slugs"
280	+	+							(+)
210	+								(+)
170	+								
100									
93	+	+							+
89	+								
75									
72									
68									
65	+								
62								+	+
54									
52	+							+	+
47	+								
45	+	+							
42	+								
38									
36									
32	+	+							
27,5	+								
26	+	+						+	
22-25 *)	+								
21									

*) mehrere Proteine

Tab. 7. Zusammenfassung der wichtigsten Resultate zur Proteinsynthese

der Entwicklung abhängig ist, ist jedoch um einiges grösser. Fünf der stark markierten Proteine bauen gleichzeitig ^{14}C -Glucosamin ein, sind also Glykoproteine. Die meisten Kernproteine werden in geringer Menge während der gesamten Entwicklung synthetisiert, und die Synthese-Aktivität erreicht entweder zwischen Aggregation und "tip"-Bildung (z.B. 210 kd, 52 kd, 42 kd) oder während der Migration ein Maximum (z.B. 38 kd, 36 kd). Im ersten Fall kann die Syntheserate hoch bleiben (210 kd, 52 kd) oder wieder abfallen (170 kd, 42 kd; Abb. 18 und Tab. 1).

Langzeitmarkierungen zeigen, dass die einmal synthetisierten Proteine zum grössten Teil während der gesamten Entwicklung erhalten bleiben (Abb. 20 und Tab. 3). Davon ausgenommen sind einige niedermolekulare Proteine (23-25 kd), die sowohl bei Kurzzeit- wie bei Langzeitmarkierungen nur während der ersten Stunden der Entwicklung erkennbar sind.

In Langzeitmarkierungen treten auch einige Proteine auf, die mit sogenannten Kurzzeitmarkierungen nicht erfasst werden (85 kd, 48 kd). Da die einmal synthetisierten Proteine erhalten bleiben, ist nicht anzunehmen, dass die erst spät im Kern erscheinenden Proteine Abbauprodukte von frühen Kernproteinen sind. Es könnten Proteine sein, die eine sehr geringe Syntheserate aufweisen und nur langsam aus dem Cytoplasma in den Kern einwandern.

Die Proteine mit Molekulargewichten von 38 kd und 27,5 kd sind sowohl in Kurzzeit- wie in Langzeitmarkierungen sehr früh in der Entwicklung erkennbar, verschwinden dann und treten relativ spät in der Entwicklung wieder auf. Ich habe nicht untersucht, ob die spät auftretenden Proteine mit den frühen identisch sind. Dies wäre auf Grund der Untersuchungen von Zada-Hames & Ashworth (1978) leicht vorstellbar. Die Autoren stellen nämlich während der Entwicklung von Ax-2-Zellen zwei Phasen von mitotischer Zellteilung fest, die erste beim Einsetzen der Entwicklung und die zweite zwischen "tip"-Bildung und Anfang Kulmination. Während beiden Phasen wird auch DNA synthetisiert. Es ist jedoch zu beachten, dass während der Differenzierung von Dd keine zeit-

liche Uebereinstimmung von Histon- und DNA-Synthese gefunden wurde (Führer-Krüsi, 1979). Durston & Vork (1978) stellen auch in "slugs" von NC-4-Zellen DNA-Synthese fest. Ein Zusammenhang mit Replikation und Zellteilung ist auch für andere Proteine, die zwischen später Aggregation und Anfang Kulmination verstärkt synthetisiert werden, in Betracht zu ziehen.

Protein-Synthese nach Desaggregation: Wenn Zellen während der Entwicklung desaggregiert werden, wird unabhängig vom erreichten Stadium die Synthese der meisten NH-Proteine unterbrochen. Die Synthese dieser Proteine wird während der Reaggregation nicht von vorne wiederholt, sondern bei Erreichen des Stadiums, in welchem die Zellen desaggregiert worden sind, wieder aufgenommen. Im Gegensatz zu der erwähnten, mit der Entwicklung korrelierten Synthese von Enzymen und von Plasmamembran-Proteinen, welche bei der Redifferenzierung nochmals von vorne abläuft, wird die Synthese dieser NH-Proteine nicht neu initiiert, sondern nur fortgesetzt. Vermutlich wird während der Desaggregation nur die Synthese der RNA und der Proteine unterbrochen, und die bereits synthetisierten Moleküle werden entweder nicht oder reversibel inaktiviert. Dies lässt vermuten, dass solche Proteine für den Ablauf des Entwicklungsprogramms nicht unbedingt nötig sind, oder dass zumindest keine Wiederholung der Synthese nötig ist.

Hingegen könnten NH-Proteine, die während der Reaggregation wieder synthetisiert werden, für die Kontrolle der Entwicklung wichtig sein. Aus Abb. 22 und Tab. 4 wird ersichtlich, dass dies nur wenige und z.T. nur schwach markierte Proteine sind. Auffallend ist dabei ein Protein von 100 kd. Es wird bei der Reassoziierung von desaggregierten "tips" und "fingers" intensiv synthetisiert, ist aber bei der Reaggregation von dissoziierten Aggregaten und bei "normaler" Entwicklung kaum erkennbar. Bei der Reassoziierung immer synthetisiert werden einige Proteine, die während der normalen Entwicklung relativ früh erscheinen und in späten Stadien nicht mehr markiert werden, in Langzeitmarkierungen aber erhalten bleiben (62 kd, 54 kd, 47 kd). Die

Synthese dieser Proteine scheint mit dem Entwicklungsprogramm gekoppelt zu sein. Dies verleitet zur Annahme, dass sie mit der Genregulation zu tun haben könnten. Mit Ausnahme des Proteins von 100 kd sind sie zwar bereits im Kern von desaggregierten Zellen vorhanden. Eine nochmalige Synthese scheint darum erst nötig, wenn die Proteine während der Differenzierung in irgendeiner Art "inaktiviert" werden.

	Einbau von ^{14}C -Acetat in Actin von	
	Kernen	Plasmamembranen *)
t_0 - Präaggregation	+	++
Präaggregation - "tips"	+++	+++
"tips" - "fingers"	++	++
"fingers" - Anfang Kulmination	(+)	+
Reassoziierung von des- aggregierten "slugs"	-	++

*) (Parish & Schmidlin, 1979 a, b)

Tab. 8. Vergleich des Einbaus von Actin in Kerne und in Plasmamembranen

Die durch die Desaggregation erfolgten Änderungen in der Actinsynthese zeigten ein überraschendes Resultat. Während der Differenzierung verläuft die Synthese von Plasmamembran-assoziiertem Actin (Teil des Cytoskeletts) und Kern-Actin gleich (Tab. 8). Doch während nach der Desaggregation von "slugs" Plasmamembran-assoziiertes Actin wieder intensiv synthetisiert wird, zeigen Kerne keinen Einbau von neu synthetisiertem Actin (Tab. 8). Dies lässt vermuten, dass die Synthese der beiden Actin-Gruppen getrennter Kontrolle unterliegt.

4.2.2. Phosphorylierung

In vitro: Kernproteine werden in Gegenwart von $[\mu\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP sehr schnell phosphoryliert. Nach 60 sec beginnt bereits die Dephosphorylierung, was auf Phosphatase-Aktivität schliessen lässt. Während für die Histone einige spezifische Phosphatasen gezeigt werden konnten (Fuhrer-Krüsi, 1979) werden die meisten NH-Proteine mit annähernd gleicher Rate dephosphoryliert. Durch Polyamine wird die Phosphorylierungsaktivität bis um 30% stimuliert, das Phosphorylierungsmuster dagegen nicht verändert. Unsere Ergebnisse lassen sich demzufolge nicht mit denen von Atmar et al. (1978) vergleichen. Die genannten Autoren finden nämlich bei der Phosphorylierung von Kernen aus *Physarum polycephalum* vier Proteine, die nur in Gegenwart von Polyaminen markiert werden. Die Zugabe von Polyaminen zum Phosphorylierungsansatz vermag bei Dd auch nicht die Kinetik des Phosphat-Einbaus zu verändern, wie dies Farron-Fürstenthal & Lightholder (1978) für Kerne aus Rattenleber beschreiben.

Die Zugabe von cAMP oder cGMP verändert das Phosphorylierungsmuster ebenfalls nicht. Dies könnte auf Änderungen in der Chromatin-Struktur im Verlaufe der Kernisolation zurückzuführen sein, welche bewirken, dass die Protein-Kinasen ihre Abhängigkeit von cyclischen Nukleotiden verlieren. Fuhrer-Krüsi (1979) zeigte, dass Protein-Kinasen des Kernes durch niedrigen pH inaktiviert werden. Diese können durch DNasen partiell reaktiviert werden, und die so erreichte Aktivität lässt sich durch cyclische Nukleotide nochmals erhöhen.

Während für verschiedenste tierische Organismen und für Dd die Existenz von cytoplasmatischen cAMP-abhängigen Protein-Kinasen unbestritten ist, liegen für die endogenen Kinasen von Kernen widersprüchliche Ergebnisse vor (Review von Jungmann & Kranias, 1977). So beschreiben verschiedene Autoren für Kerne aus Rattenleber die Existenz von zwei bis mehreren cAMP-unabhängigen Protein-Kinasen (Desjardins et al., 1972, 1975; Dastugue et al.,

1974; Thornberg & Lindell, 1977). Kish & Kleinsmith (1974) dagegen isolierten aus Kernen von Rinderleber 12 verschiedene Protein-Kinasen, von denen einige durch cAMP stimuliert, einige durch cAMP gehemmt, und andere nicht beeinflusst werden. Nach Jungmann et al. (1975) können cAMP-unabhängige Phospho-Kinasen auch über eine durch cAMP bewirkte Translokation der katalytischen Untereinheit aus dem Cytoplasma in den Kern reguliert werden. Für Dd könnte ein entsprechender Mechanismus postuliert werden, da cAMP in der Entwicklung und Differenzierung eine Schlüsselrolle einnimmt und sich in isolierten Kernen keine cAMP-abhängigen Kinasen finden lassen.

In Kernen und in Nukleolen werden mit einer Ausnahme die gleichen Proteine phosphoryliert. Ein niedermolekulares Protein (21 kd) wird nur in Nukleolen phosphoryliert. Dieses Protein findet sich auch in Mono- und Dinukleosomen. Kühn et al. (1979) zeigen, dass die ribosomale DNA von Physarum spezifisch durch ein nukleäres Phosphoprotein reguliert sein könnte.

Das Vorhandensein von NaCl im Inkubationsmedium verändert das Phosphorylierungsmuster. Von einigen Proteinen wird die Stärke der Markierung verändert, und einige Proteine (20 - 36 kd) werden neu phosphoryliert. Diese Resultate zeigen, wie die Chromatinstruktur das Phosphorylierungsmuster beeinflusst. Die meisten Phosphoproteine werden durch NaCl teilweise vom Chromatin freigesetzt und einige (20 - 26 kd) werden vollständig abgelöst. Neben den phosphorylierten Histonen bleiben nur zwei NH-Phosphoproteine (42 und 36 kd) vollständig an Chromatin gebunden. Diese Ergebnisse sind von Bedeutung für die Idee, dass fest gebundene Proteine mit der Genregulation zusammenhängen. Wie schon früher erwähnt, besteht aber kein Grund anzunehmen, dass fest gebundene Proteine nicht auch in löslicher oder leicht mit Chromatin assoziierter Form vorliegen.

Während der Entwicklung nimmt die Phosphorylierung sowohl in Bezug auf Aktivität wie auf Anzahl der phosphorylierten Proteine ständig ab. Es treten auch keine neuen Phosphoproteine auf.

In vivo: Bei Markierung von stationären Zellen mit anorganischem ^{32}P werden ungefähr 20 NH-Proteine phosphoryliert. Nur wenige davon entsprechen den in vitro phosphorylierten Proteinen. Die Markierung ist allgemein schwach, und neben den phosphorylierten Histonen ist nur ein Protein von 67 kd stark markiert. Die in vivo Phosphorylierung nimmt während der Entwicklung ebenfalls beständig ab. Zwei neue Phosphoproteine (93 und 75 kd) treten zwischen "tip"- und "slug"-Stadium auf. Sowohl die in vivo- wie in vitro-Experimente zeigen, dass die Phosphorylierung während der Differenzierung abnimmt. Dies ist nicht auf "Sättigung" der Phosphorylierungs-Stellen zurückzuführen, da eine Abnahme auch bei Langzeitmarkierungen in vivo erfolgt. Die Abnahme der Phosphorylierung könnte eine fortschreitende Reduktion der Transkription während der Differenzierung widerspiegeln. Es könnte entweder die Protein-Kinase inaktiviert oder die Chromatin-Struktur so verändert werden, dass das Substrat nicht mehr verfügbar ist. Eine kontinuierliche Abnahme des Phosphatgehaltes und des Phosphateinbaus in vivo beschreibt Magun (1974) auch für die phenollöslichen Kernproteine von Zellen von Physarum, die einer verlängerten Hungerphase unterworfen werden. Eine Abnahme des Phosphateinbaus verbunden mit einer gleichzeitigen Änderung des Phosphorylierungsmusters lässt sich auch während der Entwicklung und Differenzierung von Seeigelembryonen zu Pluteus-Larven verfolgen (Platz & Hnilica, 1973).

Unterschiedliche Resultate für die in vivo- und in vitro-Phosphorylierung beschreiben auch Böhm et al. (1977) und Neumann et al. (1978). Es ist möglich, dass mit der in vivo-Markierung Chromatin-Proteine erfasst werden, welche direkt nach der Synthese im Cytoplasma phosphoryliert werden, wie dies für einige Histone gezeigt wurde (Ruiz-Carillo et al., 1975; Jackson et al., 1976). Dabei könnten u.a. Phosphorylierungsstellen zugänglich sein,

die bei in vitro-Markierungen durch Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen blockiert sind (Böhm et al., 1977). Andererseits können, wie erwähnt, auch Änderungen in der Chromatin-Struktur während der Kern-Isolierung für die Unterschiede zwischen in vivo und in vitro Phosphorylierung verantwortlich sein.

Allgemein lässt sich feststellen, dass die maximale Synthese bestimmter NH-Proteine in spezifischen Entwicklungsstadien erfolgt. Diese Proteine werden z.B. nicht synthetisiert, wenn die Zellen in Puffer geschüttelt werden. Die meisten dieser Proteine werden während der Reassoziierung von desaggregierten Zellen nicht wieder synthetisiert. Deren Synthese scheint also für die Entwicklung nicht absolut nötig zu sein. Die Resultate schliessen aber auch nicht aus, dass sie doch eine bestimmte Rolle spielen.

Ich vermutete, dass das Entwicklungsprogramm während der Desaggregation ausgelöscht werden könnte, indem die Synthese von regulatorischen Proteinen unterbrochen wird und diese vom Chromatin "abfallen". Von solchen Proteinen wäre zu erwarten, dass sie eine kurze Halbwertszeit haben, und dass sie während der Reassoziierung neu synthetisiert werden müssen. Einige Proteine werden während der Reassoziierung auch wieder synthetisiert, doch weist keines von ihnen eine kurze Halbwertszeit auf. Eine Neusynthese ist also unnötig, sofern die Proteine nicht kurz nach der Synthese oder infolge der Desaggregation "inaktiviert" werden.

Ein Protein (100 kd) wird nur nach der Desaggregation von Kulturen, die das "tip"-Stadium erreicht haben, synthetisiert. In sich normal entwickelnden Kulturen ist es nicht vorhanden. Dieses Protein könnte für das nochmalige "Ablesen" des Entwicklungsprogrammes wichtig sein.

Während der Entwicklung wird auch eine Anzahl von Glykoproteinen synthetisiert. Dies lässt vermuten, dass sich die Zusammensetzung der Kernmembran ändert. Ob einige Glykoproteine auch

spezifisch mit Chromatin assoziiert sind, ist noch unklar.

Die Phosphorylierung von Proteinen, welche sehr schnell erfolgt und reversibel ist, könnte bei der Genregulation eine Rolle spielen. Für die Deutung der Vorgänge ergibt sich die Schwierigkeit, die Resultate von in vitro- und in vivo-Phosphorylierungen miteinander in Beziehung zu bringen. Fest steht lediglich, dass die Phosphorylierung der NH-Proteine während der Entwicklung allgemein abnimmt, was eine generelle Inaktivierung des Genoms widerspiegeln könnte. Zwei Phosphoproteine sind mit späten Stadien verbunden und werden während der Reassoziierung von desaggregierten Kulturen wieder phosphoryliert.

Es wäre nützlich zu wissen, welche der während der Entwicklung synthetisierten oder phosphorylierten NH-Proteine mit Nukleosomen assoziiert sind. Erste Experimente zeigen, dass der Hauptteil der neusynthetisierten Proteine mit Mono- und Dinukleosomen assoziiert ist.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die Nihthiston-Proteine von Dictyostelium discoideum (Dd) bezüglich ihrer Assoziation mit DNA, ihrer Lokalisierung in bestimmten Kernfraktionen und ihrer Synthese und Phosphorylierung während der Differenzierung.

Mittels eindimensionaler Gelelektrophorese lassen sich im Kern rund 70 NH-Proteine nachweisen.

Die Hauptmenge der NH-Proteine wird bei der Chromatin-Präparation mittels Salz/Wasser-Extraktion freigesetzt. Die Chromatin-Fraktion enthält die Histone und praktisch alle NH-Proteine in sehr geringer Konzentration. Die Nukleosomenstruktur bleibt erhalten.

Die mit Nukleolen assoziierten Proteine zeigen in eindimensionalen Gelen kaum Unterschiede zu den Kernproteinen. Hingegen lassen verschiedene Ergebnisse darauf schliessen, dass Nukleolen eine andere Protein-DNA-Interaktion aufweisen: 1) Die Micrococcus-Verdauung von Nukleolen führt zu spezifischen DNA-Fragmenten. 2) Sowohl bei der "Chromatin"-Behandlung wie bei der Auftrennung von DNP-Partikeln in zweidimensionalen Gelen werden die Histone befreit und die fest an DNA gebundenen Proteine zeigen eine andere Zusammensetzung als im Kern. Die Kernmembran von Dd enthält viele Glykoproteine und nur wenige andere Proteine.

Während der Differenzierung steigt die Synthese bestimmter NH-Proteine in spezifischen Stadien an. Einige dieser Proteine bauen gleichzeitig ¹⁴C-Glucosamin ein. Der überwiegende Teil der während der Entwicklung synthetisierten Proteine ist in Langzeitmarkierungen stabil.

Bei der Reassoziierung von desaggregierten Zellen wird der Hauptteil der NH-Proteine nicht neu synthetisiert. Nur einige schwach markierte Proteine werden beim Wiederholen des Ent-

wicklungsprogramms wieder synthetisiert. Sie kommen deshalb als Kandidaten für regulatorische Proteine in Frage. Ein Protein von 100 kd wird nur nach der Desaggregation von Kulturen, die das "tip"-Stadium erreicht haben, synthetisiert.

Relativ viele NH-Proteine werden phosphoryliert. Einige NH-Proteine werden sowohl in vivo und in vitro, andere nur in vivo oder nur in vitro phosphoryliert.. Veränderungen in der Chromatinstruktur während der Isolierung der Kerne könnten die Substratverfügbarkeit wie die Aktivität der Protein-Kinasen und -Phosphatasen modifizieren. Eine Abhängigkeit von cyclischen Nukleotiden lässt sich nicht nachweisen. Phosphorylierungsgrad und -rate der NH-Proteine nehmen während der Differenzierung stark ab. Bei in vivo-Markierung treten in späten Stadien zwei neue Phosphoproteine auf.

6. Literaturverzeichnis

- Allfrey, V.G.; A. Inoue; J. Karn; E.M. Johnson; R.A. Good & J.W. Hadden (1975) Ciba Found. Symp. 28, 199-228.
- Alton, T.H. & H.F. Lodish (1977) Dev. Biol. 60, 180-206.
- Bakke, A.C.; J.R. Wu & J. Bonner (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 705-709.
- Bhorjee, J.S. & T. Pederson (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3345-3349.
- Bhorjee, J.S. & T. Pederson (1976) Anal. Biochem. 71, 393-404.
- Böhm, J.; G. Keil & R. Knippers (1977) Eur. J. Biochem. 78, 251-266.
- Bonner, J.T. (1967) The Cellular Slime Molds, 2nd edn, Princeton University Press, Princeton.
- Bonner, J.; G.R. Chalkley; M. Dahmus; D. Fambrough; F. Fujimura; R.C. Huang; J. Huberman; R. Jensen; K. Marushige; H. Ohlenbusch, B.M. Olivera & J. Widholm (1968) Methods Enzymol. XII B, 3-65.
- Bonner, W.M. & R.A. Laskey (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83-88.
- Bornens, M. (1977) Nature 270, 80-82.
- Charlesworth, M.C. & R.W. Parish (1975) Eur. J. Biochem. 54, 307-316.
- Charlesworth, M.C. & R.W. Parish (1977) Eur. J. Biochem. 75, 241-250.
- Cocucci, S.M. & M. Sussman (1970) J. Cell Biol. 45, 399-407.
- Comings, D.E. & D.C. Harris (1976) J. Cell Biol. 70, 440-452.
- Compton, J.L.; M. Bellard & P. Chambon (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4382-4386.
- Coukell, M.B. & I.O. Walker (1973) Cell Diff. 2, 87-95.
- Dastugue, B.; L. Tichonicky & J. Kruh (1974) Biochimie 56, 491-500.
- Desjardins, P.R.; P.F. Lue; C.C. Liew & A.G. Gornall (1972) Can. J. Biochem. 50, 1249-1259.
- Desjardins, P.R.; C.C. Liew & A.G. Gornall (1975) Can. J. Biochem. 53, 354-363.
- Durston, A.J. & F. Vork (1978) Exp. Cell Res. 115, 454-457.

- Farron-Fürstenthal, F. & J.R. Lightholder (1978) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 83, 94-100.
- Finkelstein, D.B. & R.A. Butow (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 52-65.
- Firtel, R.A. (1972) *J. Mol. Biol.* 66, 363-377.
- Firtel, R.A. & J. Bonner (1972) *J. Mol. Biol.* 66, 339-361.
- Firtel, R.A.; A. Jacobson & H.F. Lodish (1972) *Nat. New Biol.* 239, 225-228.
- Firtel, R.A. & T. Pederson (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 301-305.
- Firtel, R.A.; P. Johnson; C.K. Wright; K.L. Kindl & M.P. Huxley (1978) unpublished, citated in Firtel, R.A. & A. Jacobson (1977) *Int. Rev. Biochem.* 15, 377-429.
- Franke, W.W. (1974) in *Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle*, S. 15-40. Ed. G. Jacobi, G. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Franke, W.W.; T.W. Keenan; J. Stadler; R. Genz, E.D. Jarasch & J. Kartenbeck (1976) *Cytobiologie* 13, 28-56.
- Fuhrer-Krüsi, S.M. (1979) Dissertation, Juris-Verlag, Zürich.
- Giles, K.W. & D.A. Myers (1965) *Nature* 206, 93.
- Gurley, L.R.; J.A. D'Anna; S.S. Barham; L.L. Deaven & R.A. Tobey (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 1-15.
- Harris, J.H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 55-104.
- Herlan, G. & F. Wunderlich (1976) *Cytobiologie* 13, 291-296.
- Hildebrand, C.E. & R.T. Okinaka (1976) *Anal. Biochem.* 75, 290-300.
- Hung, P.P. & S.G. Lee (1976) *Nature* 259, 499-502.
- Jackson, R.C. (1976) *Biochemistry* 15, 5641-5651.
- Jungmann, R.A.; S.G. Lee & A.B. DeAngelo (1975) in "Advances in Cyclic Nucleotide Research". Ed. by Drummend, G.I.; P. Greengard & G.A. Robinson, Vol. 5, 281-306. Raven Press, New York.
- Jungmann, R.A. & E.G. Kranias (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 819-830.
- Kay, R.R.; D. Fraser & I.R. Johnston (1972) *Eur. J. Biochem.* 30, 145-155.
- Kish, V.M. & L.J. Kleinsmith (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 750-760.

- Krause, M.O.; L.J. Kleinsmith & G.S. Stein (1975) *Exp. Cell Res.* 92, 164-175.
- Kühn, G.D.; H.U. Affolter; N.J. Atmar; T. Seebeck; V. Gubler & R. Braun (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 2541-2545.
- Kurth, P.D.; M. Bustin & E.N. Mondrianakis (1979) *Nature* 279, 448-450.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Laskey, R.A. & A.D. Miles (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
- Layne, E. (1957) *Methods in Enzymology* III, 447-454. Eds. Colowich, S.P. & N.C. Kaplan, Acad. Press, New York.
- LeStourgeon, W.M. & H.P. Rusch (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 144-158.
- LeStourgeon, W.M. & W. Wray (1974) in "Acicic Proteins of the Nucleus", 59-102. Eds. Cameron, I.L. & R.J. Jeter, Academic Press, New York.
- Lin, J.C.; C. Nicolini & R. Baserga (1974) *Biochemistry* 13, 4127-4133.
- Loomis, W.F. (1975) *Dictyostelium discoideum: A developmental system*. Academic Press, New York.
- Loomis, W.F.; R. Dimond; S. Free & S. White (1977) in "Eukariotic microbes as model developmental system", 177-194. Eds. O'Day & P. Hongen. Marcel Dekker, New York.
- Lowry, O.H.; N.J. Rosebrough; A.L. Farr & R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Magun, B.E. (1974) in "Acidic Proteins of the Nucleus", 137-158. Eds. Cameron, I.L. & J.R. Jeter, Academic Press, New York.
- Magun, B.E. (1976) *Exp. Cell Res.* 103, 219-231.
- Mayfield, J.E.; L.A. Serunian; L.M. Silver & S.C.R. Elgin (1978) *Cell* 14, 539-544.
- Monneron, A. & J. d'Alayer (1978) *J. Cell Biol.* 77, 211-231.
- Neumann, J.R.; D. Housman & V.M. Ingram (1978) *Exp. Cell Res.* 111, 277-284.
- Newell, P.C. & M. Sussman (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2990-3052.
- Newell, P.C.; M. Longlands & M. Sussman (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 541-554.

- Newell, P.C.; J. Franke & M. Sussman (1972) J. Mol. Biol. 63, 373-382.
- O'Malley, B.W.; T.C. Spelsberg; W.T. Schrader; F. Chytil & A.W. Steggles (1972) Nature 235, 141-144.
- Parish, R.W. (1972) Eur. J. Biochem. 31, 446-455.
- Parish, R.W.; J. Stalder & S. Schmidlin (1977) FEBS Letters 84, 63-66.
- Parish, R.W. & S. Schmidlin (1979)^a FEBS Letters 98, 251-256.
- Parish, R.W. & S. Schmidlin (1979)^b FEBS Letters 99, 270-274.
- Paul, J.; R.S. Gilmour; N. Affara; G. Birnie; P. Harrison; A. Hell, S. Humphries, J. Windass & B. Young (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 885-890.
- Pederson, T. & J.S. Bhorjee (1975) Biochem. 14, 3238-3242.
- Pederson, T. (1977) Biochemistry 16, 2771-2777.
- Philipp, E.-I.; W.W. Franke; T.W. Keenan; J. Stadler & E.-D. Jarasch (1976) J. Cell Biol. 68, 11-29.
- Platz, R.D. & L.S. Hnilica (1973) Bioch. Bioph. Res. Comm. 54, 222-227.
- Platz, R.D.; S.R. Grunes; G. Hord; M.L. Meistrich & L.S. Hnilica (1975) in "Chromosomal Proteins and Their Role in the Regulation of Gene Expression", 67-92. Eds. Stein, G. & L. Kleinsmith, Academic Press, New York.
- Ray, P.M. (1977) Plant. Physiol. 59, 594-599.
- Reynolds, E.S. (1963) J. Cell Biol. 17, 208-212.
- Rizzo, W.B. & M. Bustin (1977) J. Biol. Chem. 252, 7062-7067.
- Rubin, R.W.; M.C. Hill; P. Hepworth & J. Boehmer (1976) J. Cell Biol. 68, 740-751.
- Ruddon, R. & C. Rainey (1970) Bioch. Bioph. Res. Comm. 40, 152-160.
- Ruiz-Carillo, A.; L.J. Wangh & V.G. Allfrey (1975) Science (Wash, D.C.) 190, 117-128.
- Sampson, J. (1977) Cell 11, 173-180.
- Schaller, H.; C. Nüsslein; F.J. Bashoeffer; C. Kurz & J. Nietzschmann (1972) Eur. J. Biochem. 26, 474-481.
- Seebeck, T.; J. Stalder & R. Braun (1979) Biochemistry 18, 484-490.

- Sikstrom, R.; J. Lanoix & J.J.M. Bergeron (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 448, 88-102.
- Silver, L.M. & S.C.R. Elgin (1977) *Cell* 11, 971-983.
- Spurr, A.R. (1969) *J. Ultrastructure Res.* 26, 31-43.
- Stein, G.H. (1975) *Exp. Cell Res.* 90, 237-248.
- Stein, G.S. & T.W. Borun (1972) *J. Cell Biol* 52, 292-307.
- Stein, G.S.; R.J. Maus; E.J. Gabbay; J.L. Stein; S. Davis & P.D. Adawadhar (1975) *Biochemistry* 14, 1859-1866.
- Stein, G.S. & J. Stein (1976) *Bio Science* 26, 488-498.
- Stein, J.L.; K. Reed & G.S. Stein (1976) *Biochemistry* 15, 3291-3295.
- Sussman, M. (1961) *J. Gen. Microbiol.* 25, 375-378.
- Sussman, R.R. & R.P. Rayner (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 127-137.
- Teng, C.S.; C.T. Teng & V.G. Allfrey (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3597-3609.
- Thomas, T.L. & G.L. Patel (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 73, 4364-4368.
- Thornburg, V. & T.J. Lindell (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6660-6665.
- Todd, R.D. & W.T. Garrard (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4729-4738.
- Vidali, G.; L. Boffa; V.C. Littau; K.M. Allfrey & V.G. Allfrey (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4065-4068.
- Wang, T.Y. (1968) *Exp. Cell Res.* 53, 288-291.
- Wang, T.Y. (1971) *Exp. Cell. Res.* 69, 217-219.
- Weintraub, H. & M. Groudine (1976) *Science* 193, 848-856.
- Widmer, R.; S. Fuhrer & R.W. Parish (1979) *FEBS Letters* 106, 363-369.
- Wood, J.G. & F.O. Saranina (1975) *Anal. Biochem.* 69, 320-322.
- Zada-Hames, I.M. & J.M. Asworth (1978) *Developmental Bio.* 63, 307-320.
- Zasloff, M. & G. Felsengeld (1977) *Biochemistry* 16, 5135-5145.

BIOCHEMICAL EVIDENCE FOR A DISTINCTIVE CHROMATIN STRUCTURE IN NUCLEOLI OF *Dictyostelium*

Rosmarie WIDMER, Stelia FUHRER and Roger W. PARISH*

Cytologie, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Zollikerstrasse 107, 8008 Zürich, Switzerland

Received 10 August 1979

1. Introduction

The nucleosome is a ubiquitous unit of eukaryote chromatin [1–4]. The nucleosome core particles consist of 8 histone molecules and ~140 basepairs of DNA [1–4]. The length of the spacer DNA between nucleosomes is more variable, differing between species [5,6] and cell types in a particular tissue [7], while a natural homogeneity may exist within a given cell [8,9]. Transcribed and non-transcribed DNA sequences have been found organized in nucleosomes with the same repeat length [10], although the nucleosomes of potentially active genes do have a changed conformation [11,12]. The function of nucleosome heterogeneity is not known.

Estimates suggest that up to 15% of the eukaryote genome may not be packaged into nucleosomes [3]. Electron microscopy indicates that ribosomal RNA genes involved in transcription lack nucleosome structure [13–16]. Nevertheless, nuclease digestion shows ribosomal RNA genes do have a repeating structure, although whether this applies to both active and inactive genes is not known [10,17–21]. Lilley [3] notes that ribosomal RNA genes may have an exceptional nucleosome structure since they are generally 'super-active'.

The genome of *Dictyostelium discoideum* is only 11-times the size of the *Escherichia coli* genome [22] and the organism is widely used to study differentiation [23]. The morphological changes occurring during the life cycle are accompanied by modulation of gene activity [24].

We have shown that *D. discoideum* DNA is packaged into nucleosomes [25] and these have been identified in the electron microscope [26]. We were interested to discover whether differences existed between the chromatin structure of ribosomal and non-ribosomal genes. *D. discoideum* ribosomal DNA consists of non-chromosomal palindromic dimers (minichromosomes) [27]. About 180 homologous copies of ribosomal DNA, comprising 17% of the nuclear DNA, are present per haploid genome [28,29].

Here we describe a method for isolating nucleoli and, using nuclease digestion, demonstrate differences in the chromatin structure of nuclei and nucleoli.

2. Materials and methods

D. discoideum cells (strain Ax-3) were cultured and nuclei isolated as in [30,31].

We initially attempted to isolate nucleoli using the method in [32] which involves sonication of nuclei. The method proved unsatisfactory, either resulting in chromatin associated with clumps of nucleoli or fragmenting the nucleoli. The French Press gave similar results.

The method we developed to isolate nucleoli involved, firstly, the production of crude nuclei. Cells were suspended in 1 vol. dist. water and 2 vol. cold SF-medium (0.5 M sorbitol, 2.5% Ficoll, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) added. The final cell concentration was $4-5 \times 10^8$ /ml. Triton X-100 was added to give 0.1% (v/v) final conc. and the suspension stirred for 5–10 min at 18°C. Intact cells were removed by centrifugation at

* To whom correspondence should be addressed

350 X g for 2 min. The lysate was homogenized (max. speed) for 50 s in an Omnimixer 17220 (Sorvall). It was immediately diluted with 1 vol. 20 mM Tris-HCl, 4 mM CaCl₂ (pH 7.5) and centrifuged at 15 000 X g for 15 min. The sediment, containing mainly nucleoli, was resuspended in 10 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7.5) and centrifuged through a sucrose step gradient at 100 000 X g for 30 min. The sucrose concentrations were 1.5 M and 2.2 M in resuspension buffer. The sediment contained purified nucleoli.

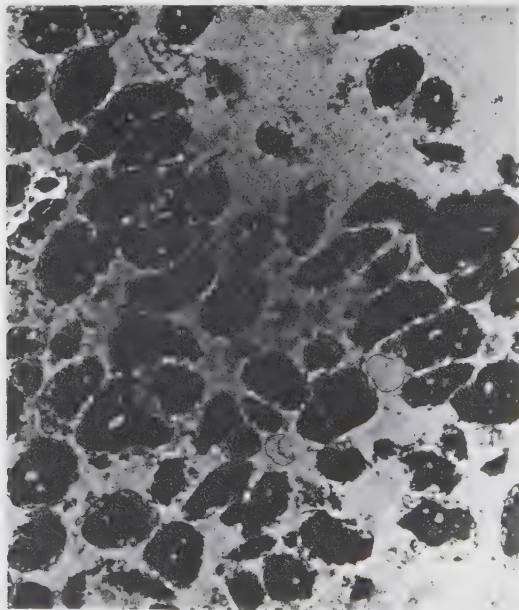
We also attempted to isolate nucleoli from purified nuclei using the same method. However, nucleoli obtained were aggregated and contaminated with non-nucleolar chromatin. This occurs because nuclei shrink during purification and fail to reach their original volume when reswollen in SF medium. Such partially shrunken nuclei are less efficiently broken during homogenization.

Nuclei ($\sim 3 \times 10^9$ /ml) or nucleoli ($\sim 10^{10}$ /ml) were incubated with 150 and 75 units micrococcal nuclease (Worthington) per ml, respectively, as in [25]. DNA was extracted as before [25] except instead of adding Sarkosyl to the samples they were incubated with 100 µg/ml proteinase K (Boehringer) and 0.4% SDS for 3 h at 37°C DNA fragments were separated on acrylamide-agarose gels according to [5].

3. Results

Electron micrographs of the purified nucleoli are shown in fig.1.

When nucleoli were incubated with micrococcal nuclease characteristic patterns of DNA fragments were obtained (fig.3a,c). As with nuclei (fig.2b,c; fig.3b), two bands were present in the monosome



a



b
Fig.1. Preparations of purified nucleoli. (a) $\times 7500$. (b) $\times 46\,500$.

region of the gel. On 5.5% polyacrylamide-agarose gels the lower band was seen to consist of two bands (fig.2b,c,e). The sizes of the monosomal bands were 168–175 (in some cases up to 185), 146–152 and 135 basepairs. Longer digestion resulted in cleavage of sites within the nucleosome core, producing a series of smaller DNA pieces (fig.2e).

The multimers obtained from nuclei are broad bands (fig.3b) and sometimes appear to consist of a number of bands [25]. The nucleolar digests contain DNA fragments resembling the nuclei multimers in size (fig.3). However, the nucleolar bands are sharper and the dimer and trimer, for example, consist of two bands at the upper and lower size limits of their respective nuclear multimers (fig.3a,b). The most striking difference is the presence of intermediate bands in the nucleolar digests (figs.3,4). Hence, two bands are always found between the dimer and trimer. In nuclear digests these bands are also present (fig.3b).

They are, however, very weak, indicating they do indeed represent a minor fraction of the nuclear DNA.

A broad but very faint band is found between the dimers and monomers (fig.3c, fig.4). A band (200–210 basepairs) has also been observed above the monosomes in some, but not all, experiments (fig.3a).

4. Discussion

We describe a method for isolating nucleoli from *D. discoideum* cells. The sonication method [32] was not a success in our hands, producing either highly contaminated nucleoli or destroying them completely.

The DNA associated with the nucleosomal core of both whole nuclei and nucleoli is ~ 135 basepairs in length. The fragments of 146–152 basepairs may be

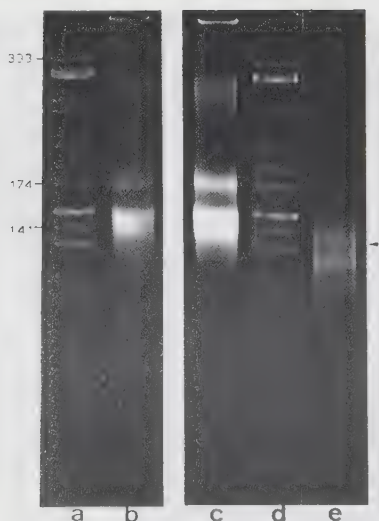


Fig.2. Polyacrylamide-agarose (5.5% and 0.5%) gel electrophoresis of micrococcal nuclease digests of nuclei (b,c,e). The arrow indicates the 135 basepair fragment. Gels were calibrated with a *Hha*I digest of plasmid pBR 322 DNA (a,d). The size (base pairs) of the marker fragments is: 393, 347, 337/332, 270, 259, 206, 190, 174, 153/152/151, 141, 132/131, 109, 104, 100.

derived from nucleosomes carrying histone H1. The 10-15 basepairs adjacent to the 135 basepairs of the core may be the site of strong interaction with histone H1 [33-35]. The largest monomers, which presumably include the linker DNA, consisted of 168-185 basepairs. Hence, the linker varies from ~30-45 basepairs in length. The value of 135 basepairs for the core is ~10 basepairs lower than for higher eukaryotes where 146 ± 3 has been reported [36]. A less likely possibility is that the 135 basepair fragment results from core digestion. The core would then be 146 basepairs when lacking H1 and 152 basepairs when H1 is present.

Our results differ from the report [26] that *D. discoideum* nucleosome contains 187 basepairs including a 137 basepair core.

Micrococcal nuclease digestion of nucleoli produces a consistent pattern of DNA fragments which is markedly different from the pattern obtained with whole nuclei. We have attempted to fit the fragment sizes into a model based on current ideas of chromatin structure. If all the fragments found are to be included we arrive at 4 different nucleosomal sizes (table 1). Nuclease splitting must also occur within the nucleosomal core, producing two halves of approximately equal size.

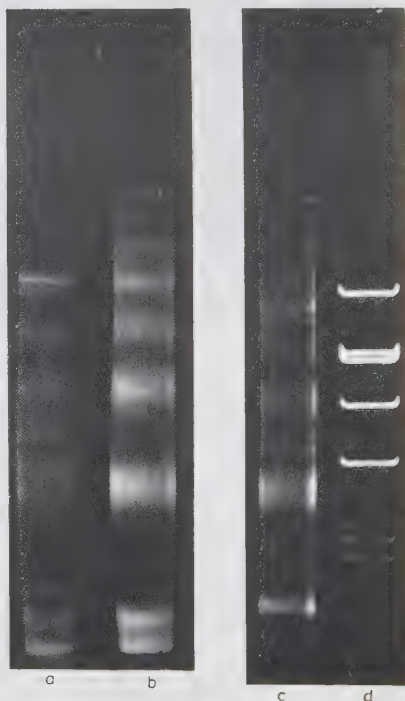


Fig.3. Polyacrylamide-agarose (2.0% and 0.5%) gel electrophoresis of micrococcal nuclease digests of nuclei (b) and nucleoli (a,c). Gels were calibrated with an *Alu*I digest of pBR 322 DNA (d). The size (base pairs) of the marker fragments is: 910, 659, 655, 521, 403, 281, 257, 224.

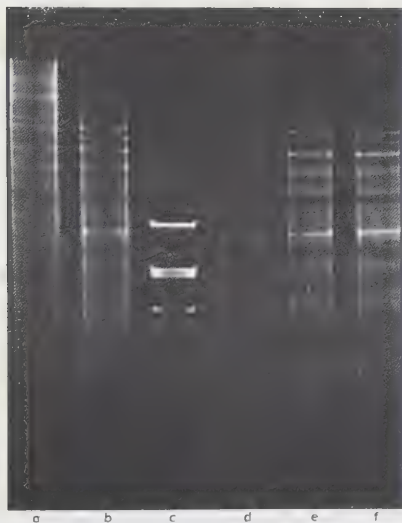


Fig.4. Gel system as in fig.3. Nucleoli were incubated with micrococcal nuclease (see section 2) for (a) 2 min, (b,e,f) 4 min or (d) 8 min. (c) *Alu* digest of pBR 322 DNA.

The simplest model would include only the 168 and 180 basepair nucleosomes. However, this would not account for three major bands (568, 780–800 and 950 base pairs). On the other hand, these fragments may be derived from regions lacking the 'typical' nucleosomal structure. Certainly, in most experiments no monosomes corresponding to the 210 and 228 basepair nucleosomes were detected. (Occasionally a 200–210 basepair band was present.) One could argue, however, that the linker regions of these monomers are exceptionally susceptible to digestion.

No sharp bands corresponding to 1.5 nucleosome fragments were found. However, a faint and broad band was present between monomer and dimer regions, suggesting the half-nucleosome is rapidly digested. Half-nucleosomes associated with two or more nucleosomes may retain their configuration and resistance to digestion.

The results suggest that nucleosomes of nucleoli possess a distinctive structure. Their apparent susceptibility to splitting may reflect a particular protein composition (e.g., histone modifications, non-histone proteins) of individual nucleosomes or packing of nucleosomal chains. We have found that deoxy-ribonucleoprotein particles from nucleoli lose many of their core proteins during gel electrophoresis,

Table 1
The lengths of DNA fragments obtained following micrococcal digestion of nucleoli fitted into a model postulating four different nucleosome sizes

Multiple	Postulated mononucleosome size (basepairs)							
	168		180		210		228	
	Predicted	Found	Predicted	Found	Predicted	Found	Predicted	Found
Dimer	336	330	360	365	420	420–440	456	450–460
2.5	420	420–440	450	450–460	530	500–535	570	568
Trimer	504	500–535	540	500–535	630	623	684	685
3.5	588	582	630	623	740 ^a	720 ^a	798	780–800
Tetramer	672	670	720	720	840 ^a	840–850	912	910
4.5	756	—	810 ^a	780	800 ^a	950		
Pentamer	840	840–850	900	910				

^a poor correspondence

whereas particles from non-nucleolar chromatin do not (unpublished results). The results give no indication of whether the distinctive nucleosomal structure is associated with active or inactive genes. We are using electron microscopy to examine the nucleosomal fibres.

The bands of nucleolar DNA are relatively narrow when compared with DNA fragments from whole nuclei. Random sliding of nucleosomal cores is probably not occurring. Various tandem arrangements of different sized nucleosomes would also not account for the fragment sizes observed. Nevertheless, some of the digestion products may reflect a novel chromatin structure with histones, for example, lying along the DNA strand. Different regions of the genome may have different structures. We are using DNA-ribosomal RNA hybridization to check this possibility.

In conclusion, nuclease digestion indicates that nucleolar chromatin possesses a unique structure. Digestion produces a consistent pattern of DNA fragments which give sharper bands than whole nuclear digests. Most striking are the bands appearing between nucleosome multimers (e.g., dimers and trimers). Analysis of DNA fragments suggests at least 2 and possibly 4 different nucleosome sizes are present and that the nucleosome core may be split by the nuclease. This implies a unique association of proteins with nucleolar DNA, reflecting perhaps the presence of specific histone and non-histone proteins which modify the structure of individual nucleosomes or the packing of nucleosomal chains. The core-splitting may be related to the 'super-activity' of ribosomal RNA genes [3].

Acknowledgements

We thank Sylvia Schmidlin and Peter Gehrig for excellent technical assistance. We are grateful to Dr R. E. Strecek and Professor H. G. Zachau, Munich, for providing pBR 322 DNA digests. The work was supported by the 'Schweizerische Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung' (grant no. 3.673-0.75).

References

- [1] Weintraub, H. and Elgin, S. C. R. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 725-774.
- [2] Kornberg, R. D. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 931-954.
- [3] Lilley, D. M. J. (1978) *Cell Biol. Int. Rep.* **2**, 1-10.
- [4] Felsenfeld, G. (1978) *Nature* **271**, 115-122.
- [5] Compton, J. L., Bellard, M. and Chambon, P. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4382-4386.
- [6] Lohr, D. E., Kovacic, R. T. and Van Holde, K. E. (1977) *Biochemistry* **16**, 463-471.
- [7] Thomas, J. O. and Thompson, R. J. (1977) *Cell* **10**, 633-640.
- [8] Todd, R. D. and Garrard, W. T. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4729-4738.
- [9] Martin, D. Z., Todd, R. D., Lang, D., Pei, P. N. and Garrard, W. T. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 8269-8277.
- [10] Gottesfeld, J. M. and Melton, D. A. (1978) *Nature* **273**, 317-319.
- [11] Weintraub, H. and Groudine, M. (1976) *Science* **193**, 848-856.
- [12] Garel, A. and Axel, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3966-3970.
- [13] Foe, V. E., Wilkinson, L. E. and Laird, C. D. (1976) *Cell* **9**, 131-146.
- [14] Laird, C. D., Wilkinson, L. E., Foe, V. E. and Chooi, W. Y. (1976) *Chromosoma (Berl.)* **58**, 169-192.
- [15] Franke, W. W., Scheer, U., Trendelenburg, M. F., Spring, H. and Zentgraf, H. (1976) *Cytobiologie* **13**, 401-434.
- [16] Scheer, U., Trendelenburg, M. F., Krohne, G. and Franke, W. W. (1977) *Chromosoma (Berl.)* **60**, 147-167.
- [17] Mathis, D. J. and Gorovsky, M. A. (1976) *Biochemistry* **15**, 750-755.
- [18] Piper, P. W., Celis, J., Kalthoff, K., Leer, J. F., Nielsen, O. F. and Westergaard, O. (1976) *Nucleic Acids Res.* **3**, 493-505.
- [19] Reeves, R. and Jones, A. (1976) *Nature* **260**, 495-500.
- [20] Reeves, R. (1976) *Science* **194**, 529-532.
- [21] Johnson, E. M., Allfrey, V. G., Bradbury, E. M. and Matthews, H. R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1116-1120.
- [22] Sussman, R. R. and Rayner, R. P. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 127-137.
- [23] Loomis, W. F. (1975) *Dictyostelium discoideum: A developmental system*, Academic Press, New York.
- [24] Firtel, R. A. (1972) *J. Mol. Biol.* **66**, 363-377.
- [25] Parish, R. W., Stalder, J. and Schmidlin, S. (1977) *FEBS Lett.* **84**, 63-66.
- [26] Bakke, A. C., Wu, J.-R. and Bonner, J. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 705-709.
- [27] Cockburn, A. F., Taylor, W. C. and Firtel, R. A. (1978) *Chromosoma (Berl.)* **70**, 19-29.
- [28] Firtel, R. A., Cockburn, A. R., Frankel, G. and Hershfield, V. (1976) *J. Mol. Biol.* **102**, 831-852.

- [29] Frankel, G., Cockburn, A. R., Kindle, K. L. and Firtel, R. A. (1977) *J. Mol. Biol.* 109, 539-558.
- [30] Charlesworth, M. C. and Parish, R. W. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 307-316.
- [31] Charlesworth, M. C. and Parish, R. W. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 241-250.
- [32] Pederson, T. (1977) *Biochemistry* 16, 2771-2777.
- [33] Whitlock, J. P. and Simpson, R. T. (1976) *Biochemistry* 15, 3307-3314.
- [34] Varshavsky, A. J., Bakayev, V. V. and Georgiev, G. P. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 477-492.
- [35] Noll, M. and Kornberg, R. D. (1977) *J. Mol. Biol.* 109, 393-404.
- [36] Mirzabekov, A. D., Schick, V. V., Belyavsky, A. V. and Bavykin, S. G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4184-4188.

Lebenslauf

Name: Rosa Maria Widmer

Heimatort: Spreitenbach, AG

Geburtsdatum: 15. April 1947

Geburtsort: Schneisingen, AG

Vorbildung: 1954-59 Primarschule, Schneisingen, AG
1959-60 Bezirksschule, Endingen, AG
1960-63 Realschule, Institut Melchtal, OW
1963-67 Kantonales Lehrerinnenseminar, Aarau
1967 Primarlehrerpatent des Kts. Aargau

Studien: 1970-75 Fakultät Phil II, Universität Zürich
1975 Diplomabschluss, Hauptfach Botanik

Leitung der
Diplomarbeit: Prof. Dr. R. W. Parish und
Prof. Dr. R. H. Hohl

Leitung der
Dissertation: Prof. Dr. R. W. Parish und
Prof. Dr. H. R. Hohl

Verzeichnis
der Dozenten: F. Bachmann, R. Bachofen, E. Batschelet,
J. Biegert, M.A. Billeter, M. Birnstiel,
H. Boesch, H. Burla, P.S. Chen, C. Claude,
C.D.K. Cook, P. Endress, C.H. Eugster,
G. Furrer, G. Gensler, E. Hadorn, W. Heitler,
H.R. Hohl, R. Humbel, R. Hütter, E. Jungen-
Hauschteck, J. Kägi, H. Kishimo, F. Knüsel,
E. Kubli, F. Leuthard, J. Lindenmann, H. Lutz,
H. Oswald, D. Rast, O. Rohweder, H. Ruffner,
R.W. Parish, H. Schäeppli, J. Schlittler,
H. Schmid, K. Schneider, M. Schüepp, B. Stüssi,
P. Tardent, E. Thomas, H. Wanner, H. Weber,
Ch. Weissmann, V. Ziswiler

gegenwärtige
Stellung: Assistent am Institut für Zellbiologie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

